



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Modelo Físico Para La Separación de Células en un Canal Step-SPLITT

Abelino Vargas Jiménez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Física
Bogotá, Colombia
2012

Modelo Físico Para la Separación de Células en un Canal Step-SPLITT

Abelino Vargas Jiménez

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias- Física

Director (a):

Ph.D. María Marcela Camacho Navarro

Codirector (a):

Ph.D. Mauricio Hoyos Hoyos

Línea de Investigación:

Biofísica

Grupo de Investigación:

Biofísica y Biología de Membranas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Física

Bogotá, Colombia

2012

A mis padres Hernando y Jeannette por su apoyo incondicional y gran amor.

A mi esposa Carolina y su hijo Tomas por la felicidad que han traído a mi vida y ser la fuente de inspiración para seguir adelante.

A mis abuelos Avelino y Bárbara quienes me enseñaron los valores y principios que hacen de mi el hombre que soy.

Agradecimientos

A mi directora de trabajo de grado la profesora María Marcela Camacho Navarro, directora del grupo Biofísica y Biología de membranas y profesora asociada al Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, por confiar en mis capacidades, enseñarme el significado de la palabra investigación y por sus aportes inmensurables a este trabajo.

A mi codirector el profesor Mauricio Hoyos Hoyos investigador asociado al laboratorio de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes en París, por enseñarme los principios fundamentales de la técnica, ayudarme en la comprensión de los principios físicos involucrados en el proceso de separación y haberme permitido trabajar en su laboratorio.

A mi colega, amiga y esposa Diana Carolina Ochoa Cabezas por facilitarme los cultivos celulares, enseñarme las técnicas usadas en este trabajo y mostrarme lo bonito que es la biología.

A mi colega y amigo Iván Camilo Navarrete por esas largas noches de trabajo en el laboratorio y disquisiciones teóricas que fijaron en mí los principios fundamentales de la técnica y dieron ideas para la elaboración de los montajes experimentales.

A mis compañeros del laboratorio de Biofísica por brindarme sus conocimientos en biología celular y sugerencias en todas las presentaciones realizadas ante el grupo.

Al Centro Internacional de Física por facilitarme los espacios y equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme desarrollar mis estudios de Maestría en Ciencias - Física.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS por haberme permitido hacer la pasantía de investigación al laboratorio del profesor Mauricio Hoyos en París, con su apoyo, a través del proyecto: Camacho M, Hoyos M. Uso de

levitación acústica para separación y clasificación de células: con aplicaciones para folículos tiroideos y células infectadas con *Leishmania* o *Plasmodium*. Presentado en la convocatoria 533 para conformar un banco de elegibles para el intercambio internacional de investigadores e innovadores en el marco de la formulación o de la ejecución de proyectos de investigación año 2011. ECOS-Colciencias. Por financiar este trabajo con equipos y materiales obtenidos en el proyecto: Camacho M, Sánchez M, Gómez MP, Stuhmer W. Estudios de la membrana de la vacuola parasitófora de *Leishmania*. 519-2010 Banco proyectos Salud-nacional Colciencias, 222851928951, Código Hermes 13002. Y además, por seguir apoyando mi formación como investigador en esta área del conocimiento, al aprobar la financiación del proyecto: Camacho M. Sistemas de separación y clasificación celular en corto tiempo, con bajo costo y alta eficiencia: uso de levitación acústica y fuerzas hidrodinámicas presentado en la convocatoria nacional para la conformación de un banco de proyectos elegibles de CTeI año 20012, 222856933541.

Resumen

El propósito de este trabajo fue explicar la separación de las poblaciones celulares presentes en un cultivo primario de células de Schwann obtenidas a partir de nervio periférico de ratón, con un modelo físico basado en los principios que sustentan la separación de especies químicas y partículas de la técnica Split-Flow Lateral-Transport Thin Fractionation (SPLITT), desarrollada en Estados Unidos en los años 80. El modelo permitió en el caso gravitacional, con la solución de las ecuaciones de movimiento de las células, determinar a priori que el flujo total $Q = 2\text{ml/h}$ permite obtener enriquecimientos de las poblaciones celulares. Para llegar a esta conclusión primero se hallaron experimentalmente las propiedades físicas de las células y el fluido usados en la separación, que posteriormente fueron introducidas, junto con las dimensiones del canal, en una simulación para determinar las trayectorias tomadas por las células al interior del canal. Por último, se evidenció experimentalmente que estas poblaciones celulares levitan en presencia de un campo acústico, lo que permite sugerir, con el uso de la simulación, que su separación se optimiza al acoplar a SPLITT campos acústicos.

Palabras clave: Separación, SPLITT, Células de Schwann, HACS, simulación.

Abstract

The purpose of this work was to explain the fractionation of cell populations present in a primary culture of Schwann cells dissociated from peripheral nerve of mice, with a physical model based on the principals of separation technique of chemical species and particles called Split-Flow Lateral-Transport Thin Fractionation (SPLITT), development in U.S.A in the 80s. By solving the movement equations for these cells, the theoretical model allowed in the gravitational case, the a priori determination of the total flow $Q=2ml/$ that enrich fractions of the cell populations. To reach to this conclusion, the physical properties of cells and fluids used in the separation were determined experimentally, replaced in the equations together with the dimensions of the channel and run in a simulation to obtain the theoretical trajectories taken by the cells inside the channel. Finally, evidence of levitation of these cells in response to an acoustic field, allows the suggestion based on the simulation, that they will be separated more efficiently by coupling SPLITT and an acoustic field.

Keywords: Fractionation, SPLITT, Schwann Cells, HACS, Simulation

Contenido

	PÁG.
RESUMEN	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XVI
INTRODUCCIÓN	1
1. TÉCNICA DE SEPARACIÓN SPLITT.....	7
1.1 GEOMETRÍA DEL CANAL.....	8
1.1.1 Canal SPLITT	9
1.1.2 Canal Step-SPLITT.....	11
1.2 TEORÍA.....	12
1.2.1 Distribución de la Velocidad en el Canal.....	12
1.2.2 Flujos en el Canal.....	13
1.2.3 Posición de los Planos ISP y OSP.....	14
1.2.4 Proceso de Transporte por Sedimentación Gravitacional.	18
1.2.5 Criterio de Separación: El Diámetro Crítico.....	21
2. PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS CÉLULAS Y EL FLUIDO.....	25
2.1 PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS CÉLULAS.....	25
2.1.1 Células de Schwann	25
2.1.2 Forma	28
2.1.3 Tamaño	30
2.1.4 Densidad	38
2.2 PROPIEDADES FÍSICAS DEL FLUIDO.....	47
2.2.1 Fluidos Usados en la Separación	47
2.2.2 Densidad	47
2.2.3 Viscosidad	49
3. MODELO FÍSICO DE LA SEPARACIÓN.....	55
3.1 SIMULACIÓN DE LA SEPARACIÓN	55
3.1.1 Dispositivo experimental.....	55
3.1.2 Sistema físico a modelar.....	56

3.1.3	<i>Fuerzas que actúan sobre la célula</i>	57
3.1.4	<i>Solución de las ecuaciones de movimiento</i>	62
3.1.5	<i>Resultados</i>	65
3.2	OTRA ALTERNATIVA EL HACS	71
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
4.1	CONCLUSIONES	79
4.2	RECOMENDACIONES	83
A.	ANEXO: FLUJOS EN EL CANAL DE SEPARACIÓN	87
B.	ANEXO: EL CONTADOR COULTER	95

Lista de figuras

	PÁG.
FIGURA 1-1: ESQUEMA DE UN CANAL HELE-SHAW	8
FIGURA 1-2: GEOMETRÍA LATERAL DE UN CANAL SPLITT..	9
FIGURA 1-3: DETALLES DE LOS COMPONENTES Y ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DE UN CANAL SPLITT..	10
FIGURA 1-4: GEOMETRÍA LATERAL DE UN CANAL STEP-SPLITT.	11
FIGURA 1-5: RELACIÓN ENTRE LA POSICIÓN wa' Y EL FLUJO Qa'	15
FIGURA 1-6: MODIFICACIÓN DEL ESPESOR wt DE LA ZONA DE TRANSPORTE.	16
FIGURA 1-7: DESPLAZAMIENTO DE LA ZONA DE TRANSPORTE A TRAVÉS DEL ESPESOR w DEL CANAL.	17
FIGURA 1-8: PARTÍCULA NO BROWNIANA QUE SE SEDIMENTA TRANSVERSALMENTE.	18
FIGURA 2-1: RELACIONES DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN CON EL AXÓN.	26
FIGURA 2-2: ELEMENTOS CONSTITUYENTES DE UN NERVI PERIFÉRICO.	27
FIGURA 2-3: CULTIVO ADHERIDO DE CÉLULAS DE SCHWANN	28
FIGURA 2-4: CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 6 DÍAS.	29
FIGURA 2-5: TAMAÑOS CELULARES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 2 DÍAS.	30
FIGURA 2-6: TAMAÑOS CELULARES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 3 DÍAS.	31
FIGURA 2-7: TAMAÑOS CELULARES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 4 DÍAS.	31
FIGURA 2-8: TAMAÑOS CELULARES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 5 DÍAS.	32
FIGURA 2-9: TAMAÑOS CELULARES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 6 DÍAS.	32
FIGURA 2-10: TAMAÑOS CELULARES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 7 DÍAS.	33
FIGURA 2-11: TAMAÑOS CELULARES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 8 DÍAS.	33
FIGURA 2-12: CALIBRACIÓN DEL COULTER PARA UNA APERTURA DE $50\mu m$	34
FIGURA 2-13: CONTEO DE LA S POBLACIONES CELULARES EN UN CULTIVO DE CELULAS DE SCHWANN . .	35
FIGURA 2-14: TAMAÑOS DE LAS POBLACIONES CELULARES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN.	36
FIGURA 2-15: TAMAÑOS DE LAS CÉLULAS PEQUEÑAS EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN.	37
FIGURA 2-16: TAMAÑOS DE LAS CÉLULAS MEDIANAS EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN	37
FIGURA 2-17: TAMAÑOS DE LAS CÉLULAS GRANDES EN UN CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN.	38
FIGURA 2-18: CAPAS OBTENIDAS CON EL GRADIENTE DE DENSIDAD 1.....	40
FIGURA 2-19: REGRESIÓN LINEAL PARA EL GRADIENTE DE CÉLULAS NÚMERO 1.....	41
FIGURA 2-20: CAPAS OBTENIDAS CON EL GRADIENTE DE DENSIDAD 2.....	43
FIGURA 2-21: REGRESIÓN LINEAL DE LOS DATOS MOSTRADOS EN LA TABLA 2-4.	44
FIGURA 2-22: DIÁMETROS DE LAS CÉLULAS EN LA CAPA SUPERIOR.....	45
FIGURA 2-23: DIÁMETROS DE LAS CÉLULAS EN LA CAPA INFERIOR.	45
FIGURA 2-24: CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN DE 25 DÍAS.	46
FIGURA 2-25: PROCEDIMIENTO PARA CALCULAR LA DENSIDAD DE LOS MEDIOS.....	47
FIGURA 2-26: AJUSTE LINEAL DE LOS DATOS MOSTRADOS EN LA TABLA 2-6, PARA EL DMEM.....	51
FIGURA 2-27: AJUSTE LINEAL DE LOS DATOS MOSTRADOS EN LA TABLA 2-7, PARA EL RPMI.....	51
FIGURA 3-1: DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.	56
FIGURA 3-2: FUERZAS SOBRE UNA CÉLULA, AL INTERIOR DEL CANAL.	56
FIGURA 3-3: VELOCIDAD ux DE LAS TRES CÉLULAS.	60

FIGURA 3-4: ERROR DE TRUNCAMIENTO.	64
FIGURA 3-5: POSICIÓN DE LA ZONA DE TRANSPORTE.	65
FIGURA 3-6: TRAYECTORIAS DE LAS POBLACIONES CELULARES PARA UN FLUJO DE 10mlh	67
FIGURA 3-7: TRAYECTORIAS DE LAS POBLACIONES CELULARES PARA UN FLUJO DE 2mlh	68
FIGURA 3-8: TRAYECTORIAS DE LAS POBLACIONES CELULARES PARA UN FLUJO DE 1mlh	69
FIGURA 3-9: PERFILES DE VELOCIDAD EN EL CANAL.	70
FIGURA 3-10: EFECTO DE LA FUERZA ACÚSTICA SOBRE LAS CÉLULAS (GOSSETT ET AL. 2010).	72
FIGURA 3-11: FUERZA ACÚSTICA Y SU CORRESPONDIENTE CAMPO DE PRESIÓN Y POTENCIAL.	73
FIGURA 3-12: LEVITACIÓN ACÚSTICA DE LAS POBLACIONES CELULARES.	74
FIGURA 3-13: PRINCIPIO DE LA SEPARACIÓN SPLITT ACÚSTICA	75
FIGURA 3-14: SEPARACIÓN ACÚSTICA DE LAS TRES POBLACIONES CELULARES.	76
FIGURA 4-1: SUSPENSIÓN INICIAL DE PARTÍCULAS.	81
FIGURA 4-2: PARTÍCULAS RECOLECTADAS EN LAS SALIDAS <i>a</i> Y <i>b</i> PARA $Q = 38,5mlh$	81
FIGURA 4-3: PARTÍCULAS RECOLECTADAS EN LAS SALIDAS <i>a</i> Y <i>b</i> PARA $Q = 69,3mlh$	82

Lista de tablas

	PÁG.
TABLA 1-1: VELOCIDADES U INDUCIDAS POR DIFERENTES TIPOS DE CAMPOS.....	20
TABLA 2-1: DENSIDADES DE LAS SOLUCIONES USADAS EN EL GRADIENTE 1.	40
TABLA 2-2: DISTANCIAS MEDIDAS A CADA CAPA	41
TABLA 2-3: DENSIDADES DE LAS SOLUCIONES USADAS EN EL GRADIENTE 2.	42
TABLA 2-4: DISTANCIAS MEDIDAS A CADA CAPA.....	43
TABLA 2-5: MASAS DEL AGUA DESTILADA Y LOS MEDIOS DE CULTIVO.	48
TABLA 2-6: ESFUERZOS CORTANTES Y GRADIENTES DE VELOCIDAD MEDIDOS PARA EL DMEM.	49
TABLA 2-7: ESFUERZOS CORTANTES Y GRADIENTES DE VELOCIDAD MEDIDOS PARA EL RPMI	50
TABLA 2-8: PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS CÉLULAS (EN LOS PRIMEROS DÍAS DE CULTIVO) Y EL FLUIDO. ...	52
TABLA 3-1: VELOCIDADES DE SEDIMENTACIÓN EN RPMI.	60
TABLA 3-2: FLUJOS USADOS EN LA SIMULACIÓN.	66
TABLA 3-3: NÚMEROS DE REYNOLDS DE LOS FLUJOS TOTALES $Q = 10mlh$, $Q = 2mlh$ Y $Q = 1mlh$. ..	71
TABLA 3-4: FLUJO USADO PARA SEPARAR LAS POBLACIONES CELULARES EN EL CASO ACÚSTICO.	75
TABLA 4-1: PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS CÉLULAS (EN LOS PRIMEROS DÍAS DE CULTIVO) Y EL FLUIDO. ...	79
TABLA 4-2: CONDICIONES EXPERIMENTALES	82

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
A	Área	m^2	
\tilde{A}	Factor de contraste acústico	1	Ec. 3.26
a	Salida superior del canal		
a'	Entrada superior del canal		
b	Salida inferior del canal		
B	Ancho del canal	m	
b'	Entrada inferior del canal		
c_{cel}	Velocidad del sonido en la célula	$\frac{m}{s}$	
C_D	Coeficiente de arrastre	1	Ec. 3.4
c_f	Velocidad del sonido en el fluido	$\frac{m}{s}$	
d	Diámetro	m	
d_c	Diámetro critico	m	Ec. 1.33
dQ	Flujo infinitesimal	$\frac{m^3}{s}$	Ec. 1.23
dt	Tiempo infinitesimal	s	Ec. 1.19
dx	Espesor infinitesimal	m	
dz	Largo infinitesimal	m	Ec. 1.20
D	Gradiente de velocidad	$\frac{1}{s}$	$\frac{\partial v}{\partial x}$
$\frac{dy}{dx}$	Ecuación diferencial de primer orden		Ec. 3.15
E	Campo eléctrico	$\frac{N}{C}$	Tabla 1-1
\vec{e}_x	Vector unitario en dirección x	1	
\vec{e}_y	Vector unitario en dirección y	1	
\vec{e}_z	Vector unitario en dirección z	1	
f	Frecuencia	Hz	$\frac{1}{T}$
$f(x)$	Función que depende de la variable independiente x		
$f(x, y)$	Función que depende de las variables x y y		
$f(x_n, y_n)$	Funciones de forma conocida		
\vec{F}_{ac}	Fuerza Acústica	N	Ec. 3.25
\vec{F}_b	Fuerza de Flotación	N	Ec. 3.2
\vec{F}_D	Fuerza de Arrastre	N	Ec. 3.3
\vec{F}_E	Fuerza de empuje	N	$m_f \vec{g}$

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
\vec{F}_g	Fuerza gravitacional	N	$m_p \vec{g}$
g	Aceleración de la gravedad	$\frac{m}{s^2}$	$\frac{d^2 y}{dt^2}$
h	Paso de tiempo en el método de Runge-Kutta	s	
k	Número de onda	$\frac{1}{m}$	$\frac{n\pi}{w}$
k_1	Coeficiente del método de Runge-Kutta		Ec. 3.17
k_2	Coeficiente del método de Runge-Kutta		Ec. 3.18
k_3	Coeficiente del método de Runge-Kutta		Ec. 3.19
k_4	Coeficiente del método de Runge-Kutta		Ec. 3.20
L	Longitud del canal	m	
m	Movilidad generalizada		Ec. 1.28
$O(h^5)$	Error por paso en el método de Runge-Kutta		Ec. 3.16
$p(x, t)$	Campo de presión	$\frac{N}{m^2}$	Ec. 3.29
p_o	Amplitud del campo de presión	$\frac{N}{m^2}$	Ec. 3.29
Q	Flujo total	$\frac{m^3}{s}$	Ec. 1.5
Q_a	Flujo en la salida a	$\frac{m^3}{s}$	Ec. 1.11
$Q_{a'}$	Flujo en la entrada a'	$\frac{m^3}{s}$	Ec. 1.10
Q_b	Flujo en la salida b	$\frac{m^3}{s}$	$Q_b = Q - Q_a$
$Q_{b'}$	Flujo en la entrada b'	$\frac{m^3}{s}$	$Q_{b'} = Q - Q_{a'}$
Q_t	Flujo en la región de transporte	$\frac{m^3}{s}$	Ec. 1.12
R	Radio de rotación	m	Tabla 1-1
Re	Número de Reynolds	1	Ec. 3.24
Re_p	Número de Reynolds de la partícula	1	$Re \left(\frac{d}{L_c} \right)^2$
r	Radio de la célula	m	
U	Velocidad de sedimentación	$\frac{m}{s}$	Ec. 1.25
U_c	Velocidad crítica Inducida	$\frac{m}{s}$	$\frac{Q_t}{BL}$
\vec{U}_o	Velocidad relativa entre el fluido y la partícula	$\frac{m}{s}$	Ec. 3.3
$\vec{U}(z, x)$	Velocidad de una partícula inmersa en un fluido	$\frac{m}{s}$	
$\vec{v}(z, x)$	Velocidad del fluido	$\frac{m}{s}$	
\bar{v}	Velocidad media del flujo total Q	$\frac{m}{s}$	Ec. 1.4
$v_z(x)$	Perfil de velocidad del flujo total Q	$\frac{m}{s}$	Ec. 1.3
w	Espesor del canal	m	
w_a	Posición del plano OSP	m	Ec. 1.16
$w_{a'}$	Posición del plano ISP	m	Ec. 1.15
w_t	Espesor de la región de transporte	m	$w_a - w_{a'}$

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
\dot{x}	Velocidad de la célula en la dirección x	$\frac{m}{s}$	$\frac{dx}{dt}$
\ddot{x}	Aceleración de la célula en la dirección	$\frac{m}{s^2}$	$\frac{d^2x}{dt^2}$
x_{big}	Solución ecuación de movimiento calculada para el paso dt		Figura 3-4
x_{small}	Solución ecuación de movimiento calculada en dos pasos $dt/2$		Figura 3-4
y_{n+1}	Soluciones de las ecuaciones diferenciales de primer orden		Ec. 3.16
\dot{z}	Velocidad de la célula en la dirección z	$\frac{m}{s}$	$\frac{dz}{dt}$
\ddot{z}	Aceleración de la célula en la dirección z	$\frac{m}{s^2}$	$\frac{d^2z}{dt^2}$

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
Δ_1	Error por truncamiento		Ec. 3.23
Δ_0	Erro ideal		
ΔH	Campo magnético	T	Tabla 1-1
ΔP	Diferencias de presiones	Pa	$P_2 - P_1$
ΔQ	Flujo transversal de partículas	$\frac{m^3}{s}$	Ec. 1.24
$\Delta \rho$	Diferencia de densidades	$\frac{Kg}{m^3}$	$\rho_p - \rho_f$
$\Delta \chi$	Diferencia de la susceptibilidad magnética	1	Tabla 1-1
ϵ	Factor de tolerancia	1	
$\bar{\epsilon}$	Energía acústica media	$\frac{J}{m^3}$	Ec. 3.25
η	Viscosidad dinámica	$\frac{Kg}{m \cdot s}$	$v * \rho_f$
λ	Longitud de onda	m	$\frac{2w}{n}$
μ	Movilidad electroforética		Tabla 1-1
ρ_p	Densidad de la partícula	$\frac{Kg}{m^3}$	
ρ_f	Densidad del fluido	$\frac{Kg}{m^3}$	
$\Sigma \vec{F}$	Sumatoria de fuerzas	N	Ec. 3.10
ς	Magnitud del campo aplicado		Ec. 1.28
τ	Esfuerzo cortante	$\frac{N}{m^2}$	$\frac{f_t}{A}$
ϕ	Potencial acústico	J	Ec. 3.27
ω	Frecuencia angular	$\frac{rad}{s}$	$2\pi f$

Subíndices

Subíndice	Término
<i>ac</i>	Acústica
<i>agua</i>	Agua destilada
<i>b</i>	Flotación
<i>big</i>	Grande
<i>cel</i>	Célula
<i>cel1</i>	Población celular 1
<i>cel2</i>	Población celular 2
<i>D</i>	Arrastre
<i>D_x</i>	Arrastre en dirección <i>x</i>
<i>D_z</i>	Arrastre en dirección <i>z</i>
<i>DMEM</i>	Medio de cultivo DMEM
<i>E</i>	Empuje
<i>f</i>	Fluido
<i>g</i>	Gravitacional
<i>i</i>	Índice entero
<i>med</i>	Medio
<i>n</i>	Índice entero
<i>p</i>	Partícula
<i>pic</i>	Picnómetro
<i>RPMI</i>	Medio de cultivo RPMI 1640
<i>SIP</i>	Solución isotónica de Percoll
<i>small</i>	Pequeño
<i>t</i>	Transporte
<i>total</i>	Total

Abreviaturas

Abreviatura	Término
HACS	Hydrodynamic – Acoustic Cell Sorter
ISP	Inlet Splitting Plane
<i>Kd</i>	Diámetro de calibración constante
OSP	Outlet Splitting Plane
SFB	Suero fetal bovino
SIP	Solución Isotonica de Percoll
SPLITT	<i>Split-Flow Lateral-Transport Thin Fractionation</i>

Introducción

Las técnicas de separación de especies de gran tamaño ($>1\mu\text{m}$) son esenciales en aplicaciones clínicas, ambientales y biológicas, por ejemplo la separación de células ($>20\mu\text{m}$) en terapias de cáncer, la remoción de residuos ($\sim 10\mu\text{m}$) en agua contaminada (Bhagat *et al.* 2008, Lee *et al.* 2001) y la separación de células infectadas con parásitos (Hoyos *et al.* 2009). En aplicaciones biológicas la obtención de poblaciones celulares con alta pureza y función conservada es crucial en muchos modelos celulares en investigación y trascendental en terapia celular y medicina regenerativa basada en células. En los métodos de separación utilizados para la purificación de células, es común emplear medios porosos o filtros (cromatografía), fuerzas gravitacionales altas (centrifugación) o métodos químicos (gradientes de Percoll) que someten a las células a altos niveles de estrés mecánico y reacciones químicas que pueden alterar las propiedades de la membrana celular, deteriorando la viabilidad y fisiología de las células separadas. Sin embargo, existe una técnica de separación conocida como Split-Flow Thin Cell Fractionation (SPLITT), que consiste en un canal delgado a través del cual fluye un líquido con una muestra que puede ser separada por la acción de diferentes tipos de campos de fuerza transversales al movimiento del fluido, como por ejemplo: campo gravitacional, eléctrico, magnético o acústico. Esta técnica a diferencia de las demás, no somete a las células a niveles altos de estrés mecánico ya que no emplea poros ni membranas de filtración, y además, en el caso del SPLITT gravitacional las células son expuestas a fuerzas gravitacionales bajas, campos gravitacionales de 1g; por otro lado las células no necesitan preparación previa ni tratamiento particular puesto que la separación se hace utilizando el medio de cultivo celular, esto hace que la viabilidad de las células sea muy satisfactoria en comparación con los resultados obtenidos al utilizar otras técnicas de separación (Stancio *et al.* 1996).

La técnica de separación SPLITT fue desarrollada por J. Calvin Giddings durante los años 80 (Giddings 1985); en su trabajo Giddings construye canales (Giddings 1985; 1989; 1991) que permiten separaciones eficientes de partículas de Látex y proteínas

(Lavin & Giddings. 1991, Springston *et al.* 1987, Williams *et al.* 1992); en estos primeros estudios teóricos Giddings y sus colaboradores se centran en la comprensión de dos procesos de transporte (Lavin & Giddings. 1991): la sedimentación de las partículas por su interacción con el campo de fuerza (Springston *et al.* 1987) y la difusión de éstas en el interior del canal (Williams *et al.* 1992); gracias a su versatilidad y teniendo en cuenta que la separación depende de las propiedades físicas de las partículas, desarrollos experimentales posteriores permitieron aumentar la selectividad de la técnica SPLITT al explorar otros parámetros físicos como sus propiedades eléctricas, magnéticas (Fuh & Chen. 1998, Hoyos *et al.* 2000) y acústicas (Ratier & Hoyos. 2010); además variaciones en la geometría del canal (Fuh *et al.* 1994, Callens *et al.* 2008, Fuh 2000) mejoraron la selectividad optimizando la separación.

Desde que la técnica SPLITT fue desarrollada a comienzos de los años 80 y hasta el momento, ésta se ha usado en la separación de proteínas (Lavin & Giddings. 1991), en separación y enriquecimiento de partículas de látex (Springston *et al.* 1987), almidón (Contado *et al.* 1999) o sílice (Contado & Hoyos. 2007) y en la purificación de agua contaminada con polvo y tierra (Lee *et al.* 2001); solo en años recientes comenzó su aplicación en la purificación de especies celulares (Hoyos *et al.* 2009). En los últimos años el Grupo de Investigación en Biofísica y Biología de Membranas del Centro Internacional de Física y Universidad Nacional de Colombia ha empleado la técnica SPLITT con el objetivo de purificar y separar diferentes estructuras celulares como: folículos tiroideos (Spinel *et al.* 2007), macrófagos infectados con *Leishmania amazonensis* (Hoyos *et al.* 2009), eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum* (Velasco 2010), vacuolas parasitoforas de *Leishmania amazonensis* (Perez 2009) y más recientemente células de Schwann (Guerrero 2010); estas separaciones se han hecho para lograr enriquecimientos de las muestras con fines preparativos. El interés del grupo por la técnica se debe principalmente a que la viabilidad de las células separadas, es muy satisfactoria, es decir, que la integridad de las células se conserva después de hacer la separación (Hoyos *et al.* 2009); además, el canal es ligero, poco costoso y la separación se hace en corto tiempo. Sin embargo, a la hora de determinar los flujos óptimos para realizar las separaciones o enriquecimientos de las especies celulares, se ha encontrado que aunque la teoría existente permite determinar estos flujos para partículas inertes (látex, sílice o almidón), en el caso de especies celulares se requiere de la pericia del experimentalista, en ocasiones de bastantes pruebas de ensayo y error,

para lograr encontrar los flujos más adecuados para una separación eficiente. Esto se debe a que parámetros importantes en la separación están relacionados con propiedades intrínsecas de la partícula como su densidad, forma y tamaño; propiedades que en el caso de las especies celulares, no pueden ser determinadas con exactitud, puesto que varían dependiendo del tipo célula, los días de cultivo, las condiciones de pH, la osmolaridad del medio en el que se encuentran y si la célula está infectada por algún parásito o no.

En este trabajo se usa un modelo físico para entender y describir cómo es la separación de un grupo celular, conformado por varias poblaciones de células, a través de la técnica SPLITT en modo de sedimentación gravitacional. Esto se hizo con el objetivo de lograr la purificación de una de estas poblaciones celulares con respecto a las otras, encontrando, a partir de un análisis físico, los flujos óptimos para una separación eficiente. La construcción del modelo se basó en la determinación de las propiedades físicas de las células y del fluido (medio de cultivo celular) usados en la separación, para luego hacer un análisis de fuerzas sobre las células que permitió, con la solución de las ecuaciones de movimiento por medio del método de Runge-Kutta de cuarto orden, establecer las trayectorias de estas, obteniendo así su posición en las salidas del canal. Con los resultados teóricos encontrados, al simular las trayectorias, fue posible concluir que la técnica de separación SPLITT acoplada únicamente al campo gravitacional permite purificar para flujos totales, Q , bajos, las poblaciones del grupo celular elegido; sin embargo, al final del trabajo, se propone con resultados teóricos y evidencia experimental, aumentar la resolución de la técnica al explorar otro parámetro físico de las células, su impedancia acústica. Propiedad que puede ser usada, como parámetro de separación, al acoplar a la técnica SPLITT un campo ultrasónico (Ratier & Hoyos 2010), que convierte el canal de separación Step-SPLITT en un resonador acústico (Hydrodynamic-Acoustic Cell Sorter: HACS).

Como grupo celular en este trabajo se eligieron cultivos primarios¹, conformados por tres poblaciones de células: células de Schwann, fibroblastos endoneurales y células perineurales, obtenidos a partir de nervio ciático y ganglio de la raíz dorsal de ratones

¹ Cultivos de células que son extraídas directamente del tejido.

adultos de la cepa ICR donados por el bioterio experimental de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Las células de Schwann, son el tipo celular más empleado en bio-prótesis experimentales para la reparación, porque son parte de la respuesta fisiológica que se desencadena luego de la lesión del nervio. Ante la pérdida de continuidad del nervio, estas células se auto-estimulan y secretan moléculas que promueven crecimiento de fibras nerviosas. Estas características han llevado a implantar estas células para promover regeneración de nervio en sistema nervioso central y periférico (Campenot 1993, López y Hurtado 1993, Guenard et al. 1994, Kim et al. 1994, Xu et al. 1995, Van den Berg et al. 1995, Perdomo y Camargo 2001, Perdomo y Spinel 2004). Sin embargo, en las prótesis diseñadas con células de Schwann se requiere que las proporciones de éstas y fibroblastos endoneurales sean aproximadamente de 5:1 para evitar formación de estructuras fibrosas conocidas como neurofibromas, originando nervios no funcionales; además, su construcción se ve limitada porque la purificación de los componentes celulares requieren 6-10 semanas para lograr enriquecimientos del 90% (Morrissey et al. 1991, Hu et al. 2011), tiempo en el cual el proceso de cicatrización se impone sobre la regeneración (Chen et al. 2007, Sunderland 1985, Taniuchi et al. 1986). La técnica SPLITT es usada aquí como una alternativa que permite desde los primeros días de cultivo purificar los componentes celulares básicos, células de Schwann y fibroblastos endoneurales, en corto tiempo y con una menor manipulación, para su uso posterior en la construcción de una bio-prótesis de nervio periférico y la formación, a futuro, de líneas celulares provenientes del sistema nervioso periférico.

El presente trabajo está comprendido en tres partes: En la primera parte, Capítulo I, se describen los fundamentos teóricos de la técnica SPLITT en el modo de sedimentación gravitacional, donde las diferencias en la movilidad de las células, generadas por el campo de fuerza aplicado, desempeñan un papel importante en la separación. En la segunda parte, Capítulo II, se muestran los experimentos que permitieron determinar las propiedades físicas, de las células y el fluido, que son importantes al momento de hacer las separaciones con SPLITT. La siguiente parte del trabajo, Capítulo III, está dedicada a presentar y analizar los resultados encontrados al simular las trayectorias de las células dentro del canal en el caso gravitacional. Al final de este capítulo, se sugiere por medio de evidencia experimental y de resultados teóricos, obtenidos con la simulación, que es

posible optimizar la separación de estas poblaciones celulares, al someter las células en el canal a una fuerza acústica.

1. Técnica de Separación SPLITT

La separación celular es problema cuando es necesario aislar una población celular específica, de otras. En términos generales, las separaciones pueden ser de tipo analítico, cuando se desea estudiar la composición de una muestra, o de tipo preparativo cuando la separación se realiza dentro de una serie de bio-procesos para ensayos posteriores (Wilson et al. 2000). El propósito de la separación celular es el de seleccionar positivamente (enriquecer) una población celular específica o bien remover (empobrecer) células no deseadas (selección negativa). Las células pueden separarse con base en sus propiedades físicas, por ejemplo velocidad de sedimentación (métodos físicos), o más selectivamente mediante la unión específica de anticuerpos monoclonales a antígenos celulares (métodos inmunológicos; Nordon & Schindhelm 1999). Técnicas como centrifugación aprovechan velocidad de sedimentación y citometría de flujo selección por anticuerpos. Sin embargo, estas técnicas imponen fuerzas o campos electromagnéticos, capaces de alterar la función celular (Stanciu et al. 1996), pueden ser difíciles de aplicar y algunas son costosas. Así mismo, procesos de separación que utilizan filtros y medios porosos pueden provocar modificaciones en las células y obstrucción en los dispositivos de separación, deteriorando las células aisladas para su uso posterior (Roda et al. 2009). Sin embargo, principios de la dinámica de fluidos aplicados a pequeños y delgados canales han permitido el desarrollo, durante las últimas tres décadas, de una técnica de separación de macromoléculas, partícula y células conocida como *Split-Flow Lateral-Transport Thin Fractionation* (SPLITT), en la cual se utilizan flujos a velocidades dentro del rango fisiológico con medio acuoso fisiológico para separar poblaciones celulares sin necesidad de marcaje específico y con resoluciones superiores a las de otros métodos (Camacho et al. 2012).

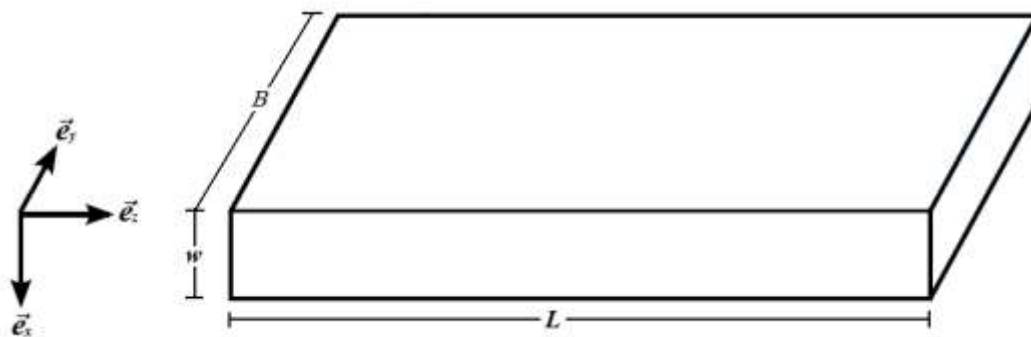
Teóricamente es posible describir la separación de partículas con la técnica SPLITT a través de los siguientes procesos de transporte: su sedimentación generada por la acción de un campo externo, como el campo gravitacional (Springston et al. 1987), su difusión en el canal, debida a los choques entre ellas o a la utilización de especies brownianas

(Williams *et al.* 1992, Contado & Hoyos. 2007) y su transporte transversal, generado por la acción de las fuerzas de sustentación hidrodinámica (Williams. 1994, Zhang *et al.* 1994). Debido a que en este trabajo se usaron poblaciones celulares, las cuales son un modelo más complejo que las partículas de Látex o Sílice, ya que su forma y densidad no están bien definidas y cambian dependiendo las condiciones externas y el tiempo de cultivo; se eligió para el desarrollo del trabajo el modelo teórico más simple: separación por sedimentación gravitacional, donde las diferencias en la movilidad de las células generadas por el campo gravitacional permiten la separación. Por tanto en este capítulo se exponen los fundamentos teóricos de la técnica de separación SPLITT en modo de sedimentación gravitacional.

1.1 Geometría del Canal

SPLITT es una técnica hidrodinámica de separación de macromoléculas, partículas y células que emplea un canal delgado rectangular de tipo Hele-Shaw, es decir, que el espesor w del canal es muy pequeño comparado con su ancho B y su longitud L (Jiménez & Naranjo 1993), Figura 1-1, por el cual fluye una muestra suspendida en un líquido vector, cuyos elementos pueden ser separados por la acción de diferentes tipos de campos² aplicados transversalmente al movimiento del fluido.

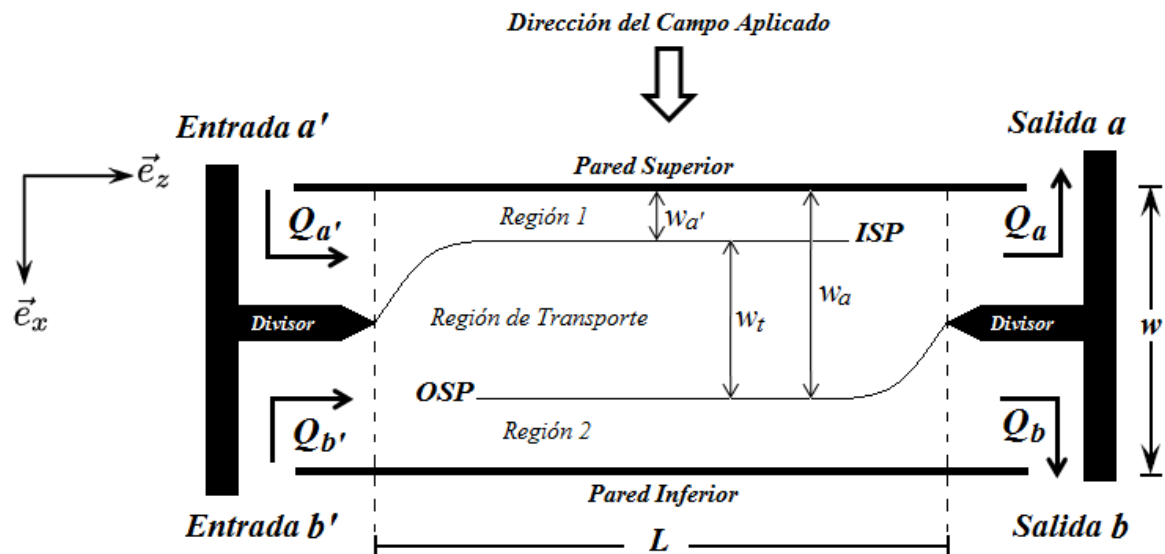
Figura 1-1: Esquema de un canal Hele-Shaw, cuyo espesor w es pequeño comparado con su longitud L y su ancho B .



² Los campos de fuerza pueden ser de tipo gravitacional, eléctrico, magnético o acústico, esto depende de la propiedad física de la partícula que se desee utilizar para realizar la separación. En la mayoría de casos suele usarse el campo gravitacional junto con otro campo.

1.1.1 Canal SPLITT

Figura 1-2: Geometría lateral de un canal SPLITT. Las líneas solidas al interior del canal representan los planos imaginarios ISP (*inlet splitting plane*) y OSP (*outlet splitting plane*) formados por los divisores de flujo en la entrada y salida del canal. Las posiciones de estos planos están dadas por las distancias $w_{a'}$ y w_a respectivamente.



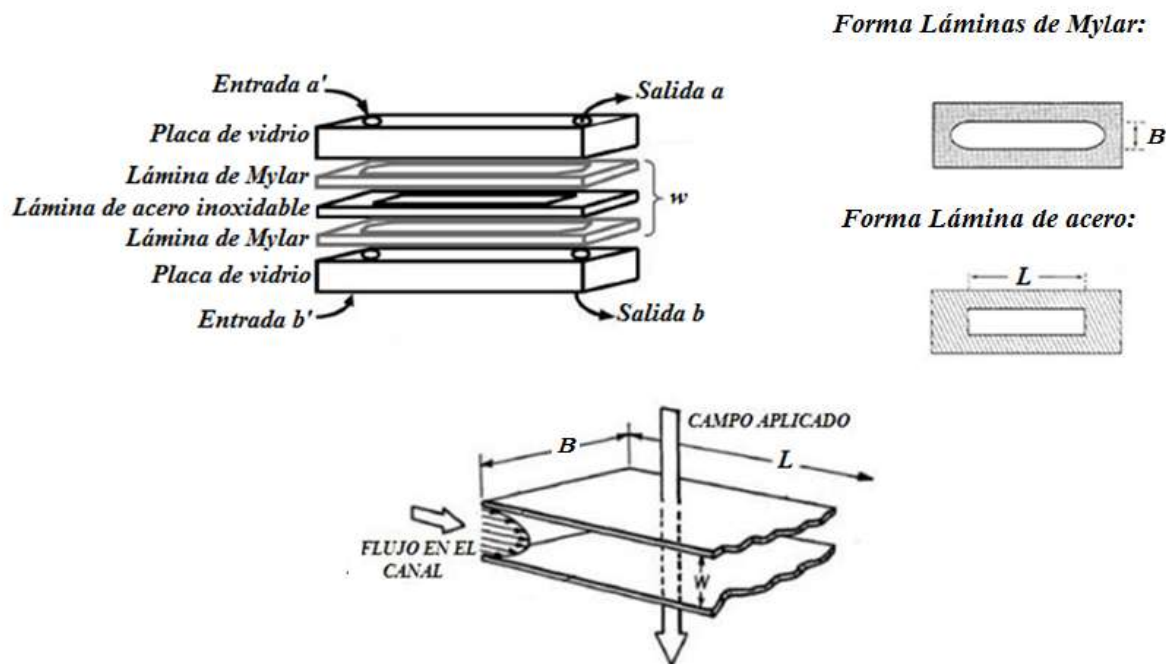
El canal de separación SPLITT, tiene dos entradas a' y b' , Figura 1-2, por las cuales se introducen la muestra suspendida en un líquido³, entrada a' , y líquido sin muestra, entrada b' , a diferentes flujos $Q_{a'}$ y $Q_{b'}$ respectivamente; al pasar por el canal la muestra es separada y una parte de esta es recolectada por la salida a , con un flujo Q_a mientras que la otra parte es recolectada por la salida b , con un flujo Q_b . Es importante notar que la separación de la muestra en dos fracciones, también depende del divisor de flujo ubicado en el extremo derecho del canal, Figura 1-2.

En la Figura 1-3 se ilustra la construcción de un canal de separación SPLITT a partir de dos láminas de Mylar o teflón, en medio de las cuales se introduce una hoja de metal, usada para formar los elementos divisores de flujo a la entrada y salida del canal; el espesor w del canal es definido al combinar el espesor de los dos espaciadores de Mylar

³ En el caso de separaciones de células el líquido que transporta la muestra y el introducido por la entrada b , corresponde al medio de cultivo celular.

con el espesor de la hoja de acero. Su longitud L es medida a partir de los extremos en los divisores (largo de la parte hueca en la lámina de acero); por último el ancho b del canal es dado por el ancho de la parte hueca en las tres láminas que constituyen el espesor w .

Figura 1-3: Detalles de los componentes y esquema tridimensional de un canal SPLITT. L representa la longitud del canal, B su ancho y w su espesor (Giddings 1989, Springston *et al.* 1987, Callens *et al.* 2008), imágenes modificadas.



Generalmente, en la construcción de un canal SPLITT, es necesario tener en cuenta que:

- La razón entre la longitud del canal y su espesor debe estar dentro del rango de 50-1000 (Callens 2005):

$$50 \leq \frac{L}{w} \leq 1000 \quad (1.1)$$

Esta condición, permite obtener al interior del canal una región de flujo laminar, en la cual es posible despreciar las variaciones de los flujos (turbulencia) cerca de los divisores.

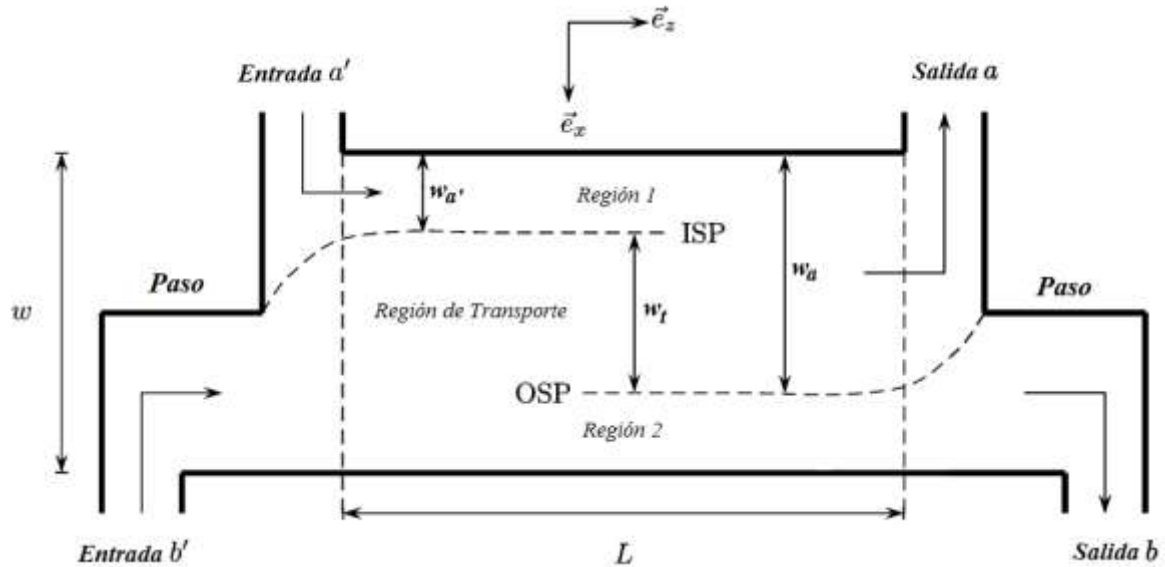
- La razón entre el ancho del canal y su espesor, debe ser mayor o igual a 10:

$$\frac{B}{w} \geq 10 \quad (1.2)$$

Esta condición, hace posible despreciar los efectos de borde generados por las paredes laterales del canal, por lo tanto, se puede considerar que existe una invariancia translacional a lo ancho (Callens 2005), es decir, a lo largo del eje y , Figura 1-1.

1.1.2 Canal Step-SPLITT

Figura 1-4: Geometría lateral de un canal Step-SPLITT, (Ratier & Hoyos 2010), imagen modificada.



En años recientes la geometría del canal SPLITT, mostrada en la Figura 1-2, ha sido modificada al remplazar los divisores de flujo por pasos como se ilustra en la Figura 1-4 (Patente: Hoyos *et al.* 2011); esta modificación del canal ha permitido reducir sus dimensiones, al variar su longitud L y evitar problemas de turbulencia en su interior generados por las deflexiones de los divisores a la entrada y salida. Aunque en esta nueva geometría de canal, conocida como Step-SPLITT, se eliminan los divisores, su principio de funcionamiento sigue siendo el mismo que el de un canal SPLITT, por tal razón, en su construcción también se tienen en cuenta las dos condiciones mencionadas anteriormente (Callen 2005).

1.2 Teoría

Para comenzar con la descripción teórica es necesario notar que en las geometrías de los canales SPLITT y Step-SPLITT, ilustradas en las Figuras 1-2 y 1-4, se pueden definir, a partir de los divisores o pasos en la entrada y salida del canal, dos planos imaginarios conocidos como ISP (*inlet splitting plane*) y OSP (*outlet splitting plane*); estos planos permiten delimitar las siguientes regiones al interior del canal:

- **Región 1:** es la región con espesor $w_{a'}$ limitada por el plano ISP y la pared superior del canal, Figuras 1-2 y 1-4. Las partículas que permanezcan en ella tienen poca movilidad transversal inducida por el campo gravitacional y por tanto, serán recolectadas en la salida a .
- **Región de Transporte:** es la región limitada por los planos imaginarios ISP y OSP, Figuras 1-2 y 1-4. Esta zona desempeña un papel crucial en la separación puesto que se comporta como una delgada membrana virtual líquida, que diferencia partículas con distinta movilidad transversal; su posición y espesor w_t pueden ser ajustados al cambiar las posiciones de los planos ISP y OSP con la variación de los flujos $Q_{a'}$, $Q_{b'}$, Q_a y Q_b a la entrada y salida del canal, lo que permite mejorar la separación.
- **Región 2:** es la región con espesor $w - w_a$ limitada por el plano OSP y la pared inferior del canal, Figuras 1-2 y 1-4; las partículas que migran a esta región durante su paso por el canal tienen alta movilidad transversal inducida por el campo gravitacional, por lo tanto, serán recolectadas en la parte inferior del canal, salida b .

1.2.1 Distribución de la Velocidad en el Canal

Si se establece, por medio de bombas de inyección y succión, una diferencia constante de presiones⁴ entre las entradas y salidas del canal, se genera al interior de éste un flujo, que si cumple con las dos condiciones geométricas mencionadas en la sección

⁴ Gradiente de presión estacionaria.

anterior (ver Ecuaciones (1.1) y (1.2)), puede ser considerado como laminar y bidimensional, plano (x,z) , en el cual los efectos generados por las paredes laterales del canal son despreciados. Teniendo en cuenta estas características del flujo al solucionar las ecuaciones de Navier-Stokes, para determinar la distribución de velocidades $v_z(x)$ entre los pasos, se tiene que la distribución encontrada corresponde a una distribución de tipo parabólico que es característica de un flujo de Poiseuille:

$$v_z(x) = 6\bar{v} \frac{x}{w} \left(1 - \frac{x}{w}\right) \quad (1.3)$$

Siendo \bar{v} la velocidad media del flujo a través del canal, la cual está dada por:

$$\bar{v} = \frac{w^2 \Delta P}{12\eta L} \quad (1.4)$$

Donde η es la viscosidad dinámica del fluido y ΔP es la diferencia de presiones entre las salidas y entradas del canal.

1.2.2 Flujos en el Canal

Debido a la versatilidad que presenta la técnica SPLIT, por la manipulación experimental de los flujos que permiten modificar el espesor y la posición de la zona de transporte, su base teórica ha sido formulada en términos de estos flujos de inyección y succión en las entradas y salidas del canal (Springston *et al.* 1987, Contado 2000). Por consiguiente, a partir del principio de conservación de la masa, se establece que el flujo total Q al interior del canal puede ser escrito como:

$$Q = Q_{a'} + Q_{b'} = Q_a + Q_b \quad (1.5)$$

Donde $Q_{a'}$ y $Q_{b'}$ son los flujos en las entradas a' y b' , y Q_a y Q_b corresponden a los flujos por las salidas a y b .

También es posible, por medio de la distribución de velocidades (ver Ecuación (1.3)), definir el flujo total Q en la forma:

$$Q = B \int_0^w v_z(x) dx = Bw\bar{v} \quad (1.6)$$

De la misma manera se pueden expresar los flujos de entrada $Q_{a'}$, salida Q_a y en la región de transporte Q_t a partir de la distribución de velocidades $v_z(x)$:

$$Q_{a'} = B \int_0^{w_{a'}} v_z(x) dx \quad (1.7)$$

$$Q_a = B \int_0^{w_a} v_z(x) dx \quad (1.8)$$

$$Q_t = B \int_{w_{a'}}^{w_a} v_z(x) dx \quad (1.9)$$

Al integrar las ecuaciones anteriores (ver anexo A) se obtiene para cada uno de los flujos:

$$Q_{a'} = 6B\bar{v} \left(\frac{w_{a'}^2}{2w} - \frac{w_{a'}^3}{3w^2} \right) \quad (1.10)$$

$$Q_a = 6B\bar{v} \left(\frac{w_a^2}{2w} - \frac{w_a^3}{3w^2} \right) \quad (1.11)$$

$$Q_t = Q_a - Q_{a'} \quad (1.12)$$

Donde $w_{a'}$ y w_a , según lo ilustrado en la figura 1-4, corresponden a las posiciones de los planos ISP y OSP respectivamente, medidas desde la pared superior del canal. Por último se debe observar que el flujo en la región de transporte Q_t es controlado directamente por los flujos a la entrada y salida del canal (ver ecuación (1.12)).

1.2.3 Posición de los Planos ISP y OSP

Si se quiere manipular experimentalmente las posiciones de los planos ISP y OSP es necesario relacionar los espesores $w_{a'}$ y w_a con los flujos $Q_{a'}$, $Q_{b'}$, Q_a y Q_b (Williams *et al.* 1992), al dividir las ecuaciones (1.10) y (1.11) por la ecuación (1.6), para obtener las razones:

$$\frac{Q_{a'}}{Q} = 3 \left(\frac{w_{a'}}{w} \right)^2 - 2 \left(\frac{w_{a'}}{w} \right)^3 \quad (1.13)$$

$$\frac{Q_a}{Q} = 3 \left(\frac{w_a}{w} \right)^2 - 2 \left(\frac{w_a}{w} \right)^3 \quad (1.14)$$

Las soluciones de las ecuaciones cúbicas (1.13) y (1.14), para $w_{a'}/w$ y w_a/w , pueden ser escritas en la forma (ver anexo A):

$$\frac{w_{a'}}{w} = \sin(\theta_1/3) + \frac{1}{2} \quad (1.15)$$

$$\frac{w_a}{w} = \sin(\theta_2/3) + \frac{1}{2} \quad (1.16)$$

Donde:

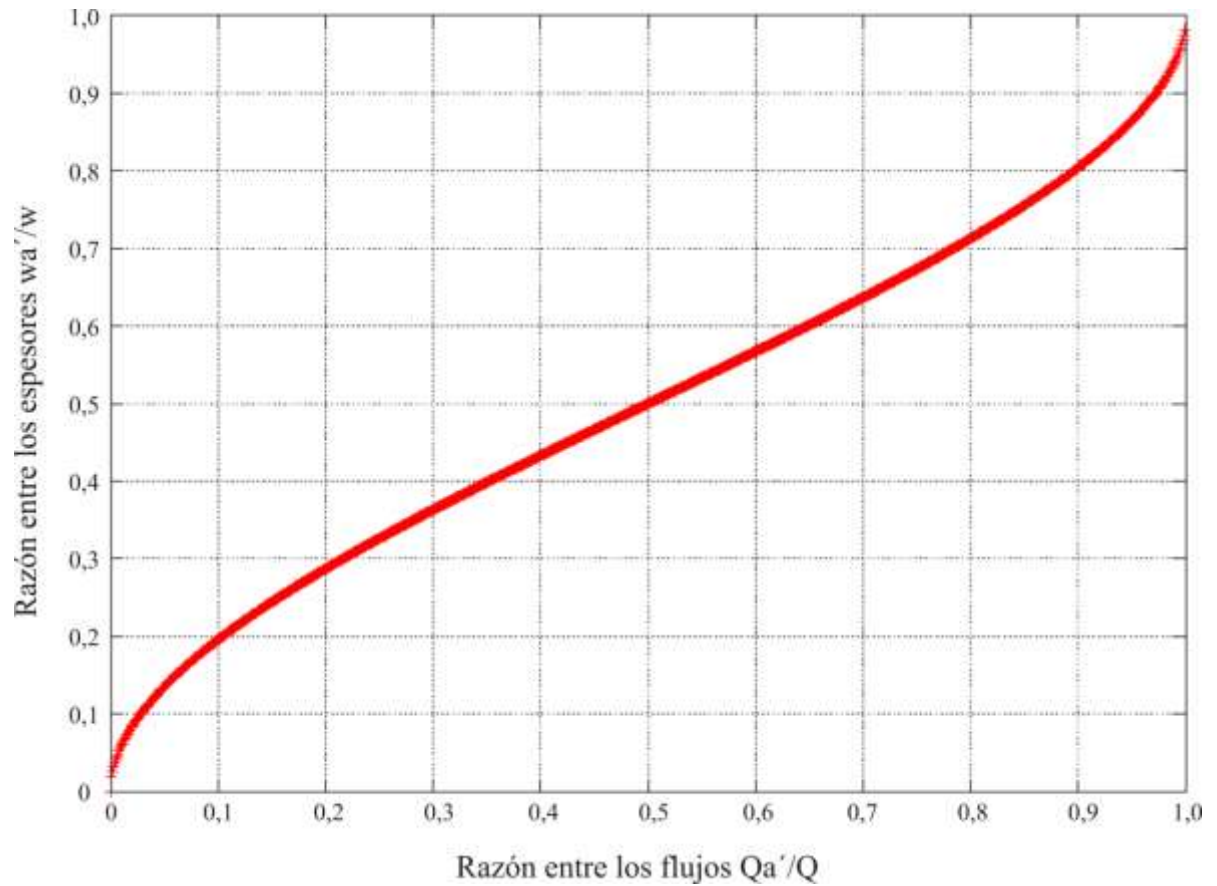
$$\sin \theta_1 = 2 \left(\frac{Q_{a'}}{Q} \right) - 1 \quad (1.17)$$

$$\sin \theta_2 = 2 \left(\frac{Q_a}{Q} \right) - 1 \quad (1.18)$$

Con θ_1 y θ_2 limitados por el intervalo $\left[-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2} \right]$.

En la Figura 1-5 se grafica el espesor de la capa inyectada, por la entrada a' , en función de la razón entre los flujos $Q_{a'}/Q$ (ver Ecuación (1.15)). Según lo observado, la relación (1.15) siempre da un número positivo y además presenta dos fases. La primera corresponde al intervalo $0 \leq Q_{a'}/Q \leq 0.2$ en el cual el comportamiento de la curva no es lineal. La segunda fase se da entre el rango $0.2 \leq Q_{a'}/Q \leq 0.8$ en el que la relación es lineal.

Figura 1-5: Relación entre la posición $w_{a'}$, normalizada por el espesor w del canal, y el flujo de entrada $Q_{a'}$, normalizado por el flujo total en el canal Q .



A partir de las gráficas de las ecuaciones (1.15) y (1.16), como la mostrada en la Figura 1-5, es posible determinar con los flujos manipulados experimentalmente, la posición de los planos ISP y OSP en el interior de un canal con un espesor w dado. Se debe recordar, como ya se mencionó al inicio de esta sección, que al variar los flujos en las entradas y salidas del canal se puede:

- Aumentar el espesor w_t de la zona de transporte, al fijar la posición del plano de entrada ISP y cambiar la posición del plano de salida OSP, como es ilustrado en la Figura 1-6.
- Desplazar la zona de transporte, con espesor w_t constante, por el espesor w del canal, al modificar al mismo tiempo la posición de los planos ISP y OSP, como se ilustra en la Figura 1-7.

Figura 1-6: Modificación del espesor w_t de la zona de transporte. La posición del plano ISP permanece fija en $Q_a/Q = 0,2$ mientras que el plano de salida OSP es desplazado al variar los flujos en la salida del canal, desde $Q_a/Q = 0,3$ hasta $Q_a/Q = 0,7$.

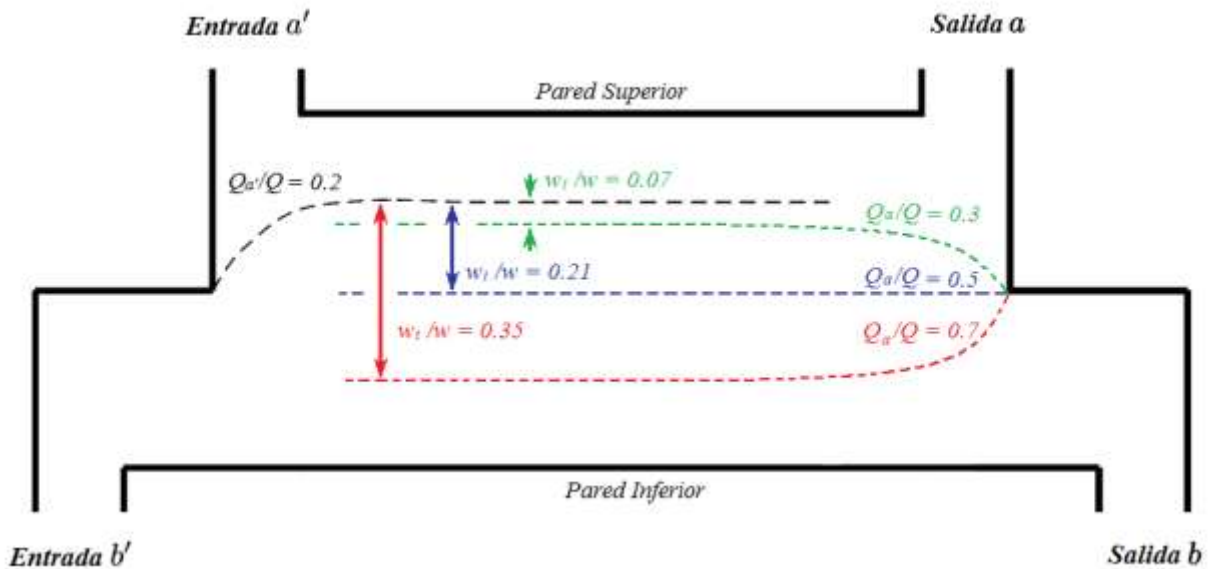
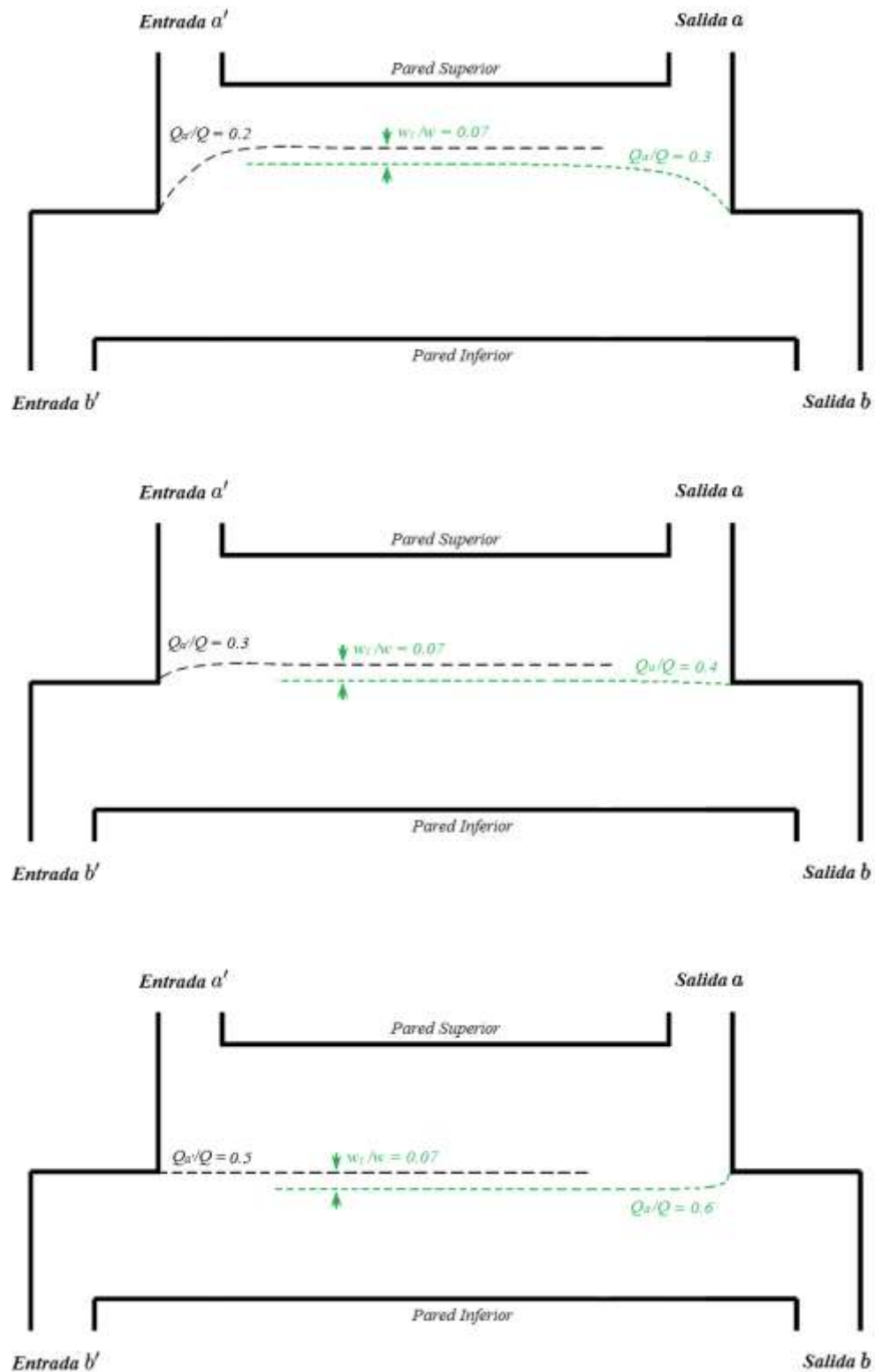


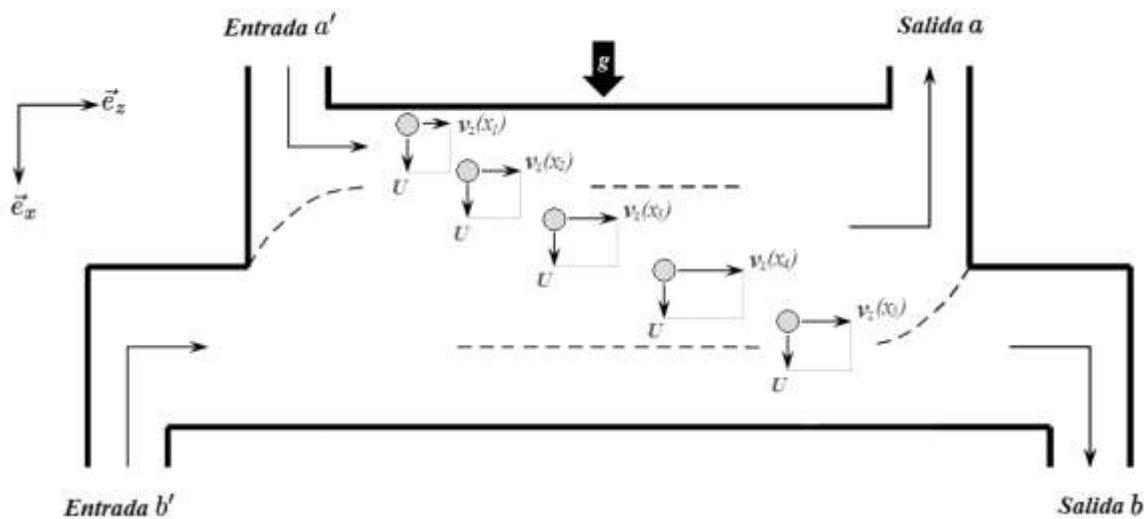
Figura 1-7: Desplazamiento de la zona de transporte a través del espesor w del canal. El espesor w_t de esta zona permanece constante.



Para terminar es importante resaltar que, en el caso de una separación por sedimentación gravitacional, el ISP es frecuentemente forzado a estar en una posición cercana a la pared superior, al imponer la condición $Q_{b'} > Q_{a'}$, lo cual comprime el flujo de alimentación $Q_{a'}$ en una pequeña lámina que contiene la mezcla a separar, focalizando así las partículas en la pared superior del canal. Entre más pequeño sea el espesor de esta lámina, mayor será la resolución alcanzada en la separación (Giddings 1992).

1.2.4 Proceso de Transporte por Sedimentación Gravitacional.

Figura 1-8: Partícula no browniana que se sedimenta transversalmente, bajo la acción de un campo gravitacional, a una velocidad U mientras es arrastrada axialmente por un flujo a una velocidad $v_z(x)$.



Al introducir una muestra en el canal las partículas que la conforman, como la ilustrada en la Figura 1-8, son sometidas a dos movimientos que son considerados independientes. El primero corresponde al arrastre axial de las partículas, generado por el flujo a lo largo del canal, que induce sobre estas una velocidad $v_z(x)$ que varía a través del espesor w según las líneas de corriente del perfil de Poiseuille. El segundo es la sedimentación inducida por el campo de fuerza aplicado, campo gravitacional, en la cual las partículas se desplazan transversalmente con una velocidad constante U conocida como velocidad de sedimentación. La posición transversal de las partículas en las salidas del canal depende de la relación entre estos dos movimientos. Si el flujo se establece de

tal manera que las partículas tienen suficiente tiempo para sedimentarse, algunas de ellas atravesarán la zona de transporte y saldrán por b , por el contrario si las velocidades axiales $v_z(x)$ son muy grandes con respecto a la velocidad de sedimentación U , las especies no tendrán tiempo de migrar hacia la pared inferior del canal y por lo tanto saldrán por a (Callens 2005).

Para definir una relación entre estos dos movimientos, que permita establecer la importancia de cada uno de ellos en la separación, se analizará infinitesimalmente el movimiento de una partícula en el canal. Si el espesor w del canal es dividido en pequeños espesores dx , entonces, una partícula en su interior, moviéndose transversalmente con velocidad de sedimentación U , recorrerá uno de estos espesores en un tiempo:

$$dt = \frac{dx}{U} \quad (1.19)$$

Durante el cual la partícula también será transportada por el flujo una distancia dz dada por:

$$dz = v_z(x)dt \quad (1.20)$$

Sustituyendo la ecuación (1.19) en (1.20) se obtiene:

$$Udz = v_z(x)dx \quad (1.21)$$

Ahora si se define el flujo infinitesimal dQ , de una lámina de espesor dx , a través del área Bdx como:

$$dQ = B[v_z(x)dx] \quad (1.22)$$

Y combinando (1.22) con la ecuación (1.21) se obtiene:

$$dQ = BUdz \quad (1.23)$$

Integrando, la ecuación (1.23), sobre toda la longitud L del canal se llega a:

$$\Delta Q = BLU \quad (1.24)$$

Donde ΔQ puede ser interpretado como el flujo transversal de partículas a través de una lámina líquida de área BL . Es importante notar que la forma de la velocidad inducida U , en la ecuación (1.24), depende del tipo de campo usado en la separación, Tabla 1-1.

Tabla 1-1: Velocidades U inducidas por diferentes tipos de campos.

<i>Campo</i>	<i>Velocidad U inducida</i>	<i>Parámetros físicos</i>
<i>Gravitacional</i>	$U_{gravitacional} = \frac{gd^2 \Delta\rho }{18\eta}$	g : Aceleración de la gravedad. $\Delta\rho$: Diferencia entre la densidad de la partícula ρ_s y la densidad del fluido que transporta a la muestra ρ_f .
<i>Centrífugo</i>	$U_{centrifuga} = \frac{\omega^2 R d^2 \Delta\rho }{18\eta}$	η : Viscosidad del fluido. ω : Velocidad angular. d : Diámetro de la partícula. (se asumen partículas esféricas)
<i>Magnético</i>	$U_{magnetico} = \frac{\Delta\chi\Delta H^2 d}{48\eta}$	ΔH : Campo magnético. R : Radio de rotación. μ : Movilidad electroforética de los componentes de la muestra.
<i>Eléctrico</i>	$U_{electrico} = \mu E$	E : Campo eléctrico. $\Delta\chi$: Diferencia entre la susceptibilidad magnética de la partícula, χ_p , y la del fluido que transporta la muestra χ_l .

Recordemos, como ya se mencionó anteriormente, que para las separaciones hechas en el trabajo se usó el campo gravitacional, entonces según lo observado en la Tabla 1-1, la velocidad inducida U para nuestro caso está dada por:

$$U = \frac{d^2(\rho_p - \rho_f)g}{18\eta} \quad (1.25)$$

Donde d es el diámetro de la partícula, ρ_p y ρ_f son las densidades de la partícula y el fluido respectivamente, g la aceleración producida por el campo gravitacional y η la viscosidad dinámica del fluido. Otra forma de escribir la ecuación (1.25) es por medio del coeficiente de sedimentación s :

$$s = \frac{d^2(\rho_p - \rho_f)}{18\eta} \quad (1.26)$$

Entonces al sustituir (1.26) en la ecuación (1.25) se llega a:

$$U = sg \quad (1.27)$$

De la misma forma es posible para cada una de las velocidades U mostradas en la Tabla 1-1 definir una relación como la observada en (1.27) para el campo gravitacional; por

tanto, se tiene para una partícula, sometida a la acción de un campo arbitrario, que la forma general de la velocidad U inducida sobre ella está dada por:

$$U = m\zeta \quad (1.28)$$

Donde m es la movilidad generalizada de la partícula y ζ es la magnitud del campo aplicado. En el caso gravitacional, transporte por sedimentación, ζ es medida por la aceleración g , en cm/s^2 , y m es el coeficiente de sedimentación (ver Ecuación 1.27); para el caso eléctrico (ver Tabla 1-1), ζ es la magnitud del campo eléctrico, en V/cm , y m es la movilidad electroforética (Giddings 1992).

1.2.5 Criterio de Separación: El Diámetro Crítico.

A partir de las ecuaciones (1.24) y (1.12), que describen los movimientos transversal y longitudinal de las partículas al interior del canal en términos de los flujos ΔQ y Q_t , es posible definir dos condiciones matemáticas que dividen las partículas, que conforman la muestra inyectada en la entrada a' , en dos grupos. Partículas que cumplen con la condición:

$$\Delta Q > Q_t \quad (1.29)$$

Serán en su mayoría recolectadas por la salida b (prima su sedimentación), mientras que aquellas que cumplan con la condición:

$$\Delta Q < Q_t \quad (1.30)$$

La mayoría serán recolectadas, por la salida a (prima su arrastre axial).

En el caso donde algunas partículas salgan por a y otras por b , es decir, cuando se cumple con la condición:

$$\Delta Q_c = Q_t \quad (1.31)$$

Es posible definir para las partículas un diámetro umbral o crítico d_c que sirve como criterio de separación. Por tanto, en el caso gravitacional se tiene, al igualar la ecuación (1.31) con (1.24) escrita para la velocidad U_c , que:

$$bLU_c = Q_t \quad (1.32)$$

Sustituyendo la velocidad U_c (ver ecuación (1.25)) en (1.32) se encuentra que el diámetro crítico, d_c , está dado por:

$$d_c = 3 \left(\frac{2\eta Q_t}{BLg(\rho_p - \rho_f)} \right)^{1/2} \quad (1.33)$$

Donde el flujo en la región de transporte Q_t depende de los flujos en la entrada a' y salida a del canal (ver Ecuación (1.12)), por tal motivo, el diámetro crítico puede ser ajustado o alterado por la variación de los flujos $Q_{a'}$ y Q_a (Fuh et al. 1992). Las partículas con un diámetro menor que d_c serán recolectadas por la salida a , mientras que las partículas con un diámetro mayor a d_c serán recolectadas por b . Por último, es necesario notar que el diámetro crítico depende únicamente de la densidad de la partícula mas no de su diámetro (ver Ecuación (1.33)), así que, en el caso de partículas con densidad uniforme solo puede ser establecido un único valor para el diámetro crítico d_c (Fuh et al. 1992).

Hasta aquí se han presentado los fundamentos teóricos de la técnica de separación SPLITT en modo de sedimentación gravitacional, en los cuales se evidencia la importancia de determinar propiedades físicas de las células y el fluido como su densidad y viscosidad, antes de hacer la separación. En el siguiente capítulo se describen los resultados encontrados experimentalmente al medir estos parámetros físicos, los cuales serán usados en el capítulo tres para establecer las trayectorias de las células en el canal.

2. Propiedades Físicas de las Células y el Fluido

En el capítulo anterior se describieron los fundamentos teóricos de la técnica de separación SPLITT en modo de sedimentación gravitacional, en los cuales se evidencia (ver Ecuaciones (1.25) y (1.33)), que es necesario, para realizar una separación con el campo gravitacional, conocer, además de la densidad y viscosidad del fluido, propiedades físicas de las partículas como su tamaño y densidad. Por tal razón en este capítulo se muestran los resultados experimentales que permitieron determinar la forma, tamaño y densidad de las poblaciones celulares que conforman los cultivos primarios de células de Schwann, así como, también los experimentos que se realizaron para encontrar la densidad y viscosidad de los medios de cultivo celular (fluidos) usados en la separación.

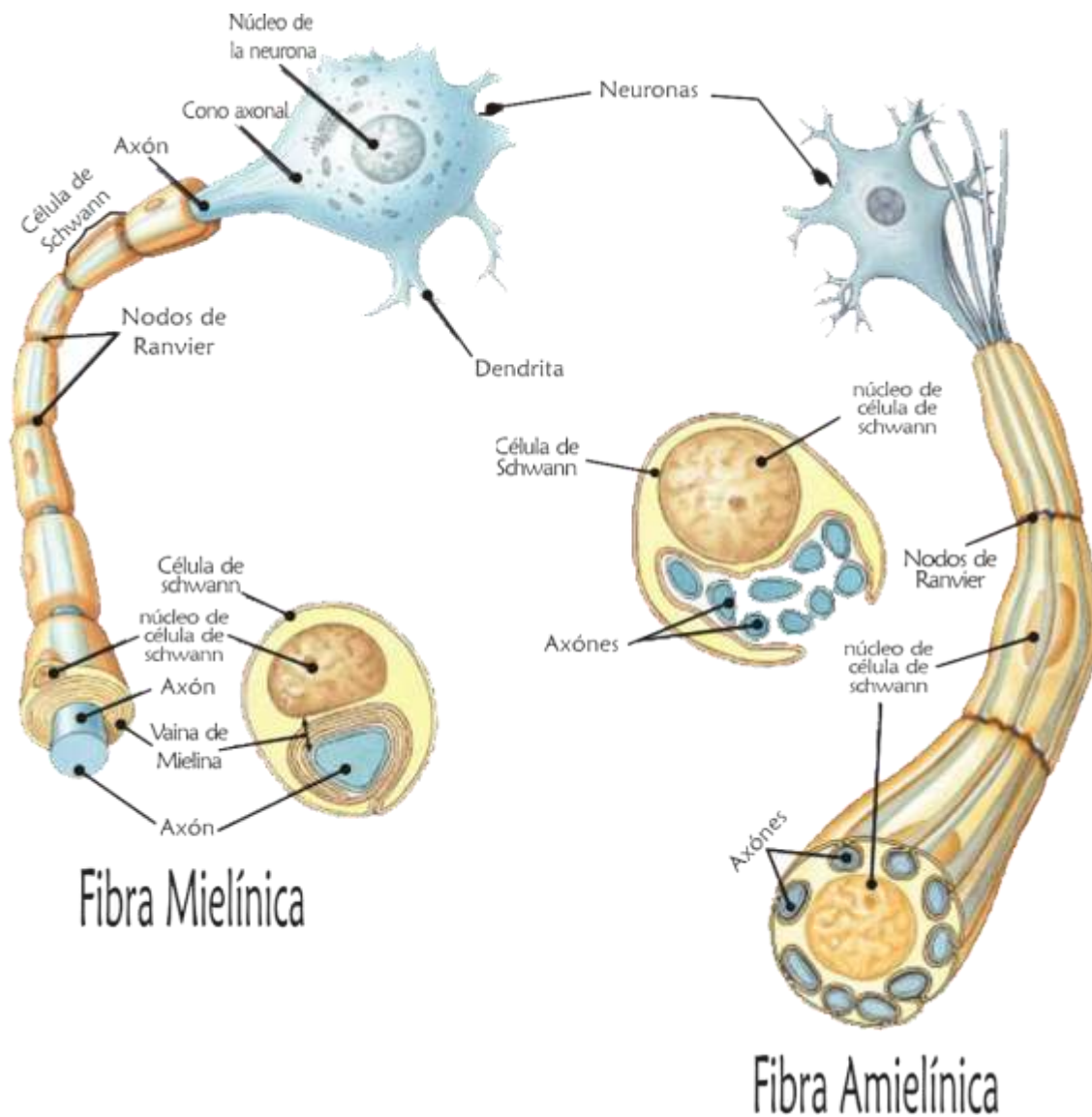
2.1 Propiedades Físicas de las Células

2.1.1 Células de Schwann

Las células de Schwann son las células acompañantes o glía del sistema nervioso periférico (Genesser 2005) que se relacionan íntimamente con el axón de dos formas: en fibras nerviosas motoras o mielínicas donde se enrollan repetidas veces, formando lo que se conoce como vaina de mielina (ver Figura 2-1) que es fundamental en la conducción rápida de los impulsos nerviosos; y en fibras nerviosas sensitivas o amielínicas donde la membrana de la célula de Schwann enrolla una sola vez varios axones (ver Figura 2-1), lo que permite y facilita el discernimiento del tipo de estímulos que llegan al sistema nervioso central (Chen *et al.* 2007, Fawcett & Keynes. 1990, Ide 1996); sin embargo tienen otras funciones menos conocidas pero igualmente importantes, como proteger al

axón de daños físicos, químicos y biológicos, regular los procesos de homeóstasis⁵ e intervienen en la innervación y regeneración de las fibras nerviosas.

Figura 2-1: Relaciones de las células de Schwann con el axón.



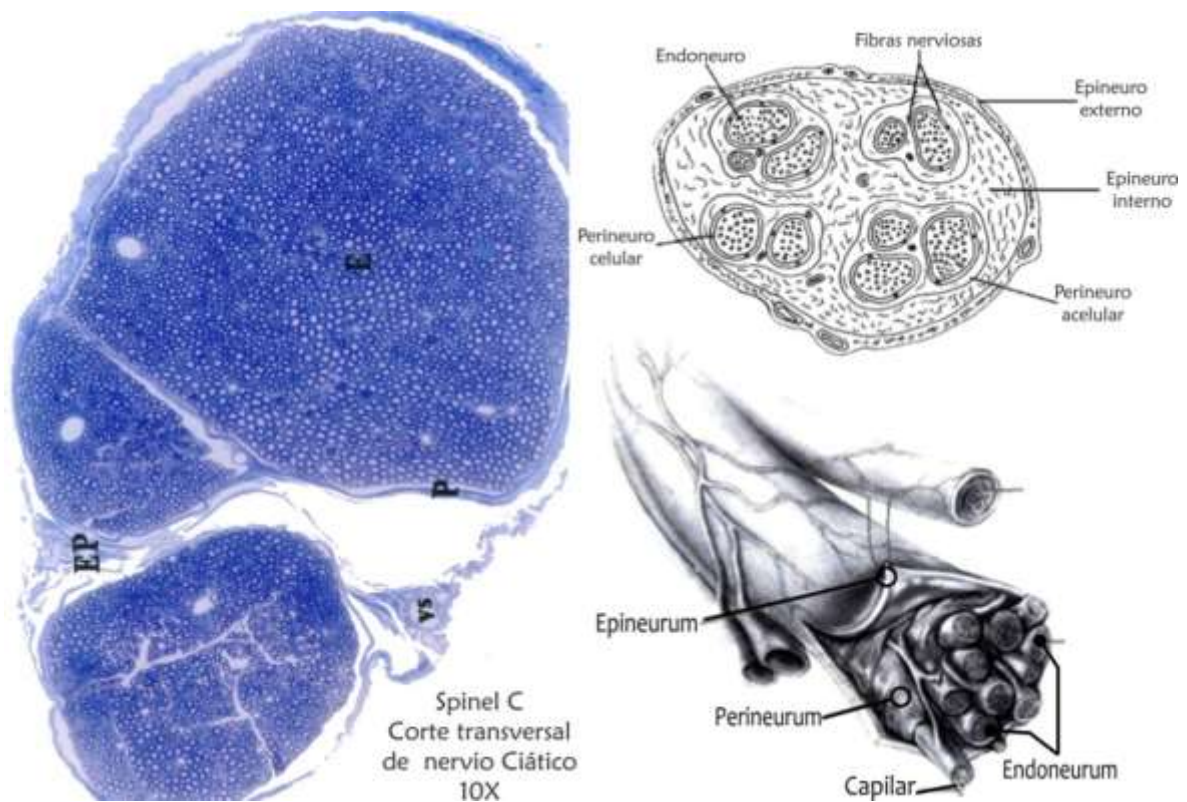
En los nervios periféricos hay estructuras bien definidas, la primera es el endoneuro que está formado por los axones envueltos por células de Schwann rodeado por una capa de colágeno⁶ que tiene inmerso fibroblastos endoneurales (principal contaminante de los

⁵ Es un proceso mediante el cual las células regulan su metabolismo interno.

⁶ Proteína fibrosa que secretan las células como componente principal de la matriz extracelular.

cultivos de células de Schwann), esta capa está envuelta por el perineuro que es una membrana compuesta por células epiteliales conocidas como células perineurales que van acompañadas de fibras colágenas y fibroblastos endoneurales y la capa más externa o epineuro que es una membrana fibrosa que provee a las fibras nerviosas de protección y resistencia (ver Figura 2-2).

Figura 2-2: Elementos constituyentes de un nervio periférico, del que se obtienen los cultivos de células de Schwann. En el corte histológico⁷, imagen en azul, **E** es el endoneuro, **P** el perineuro, **EP** el epineuro y **VS** un vaso sanguíneo.



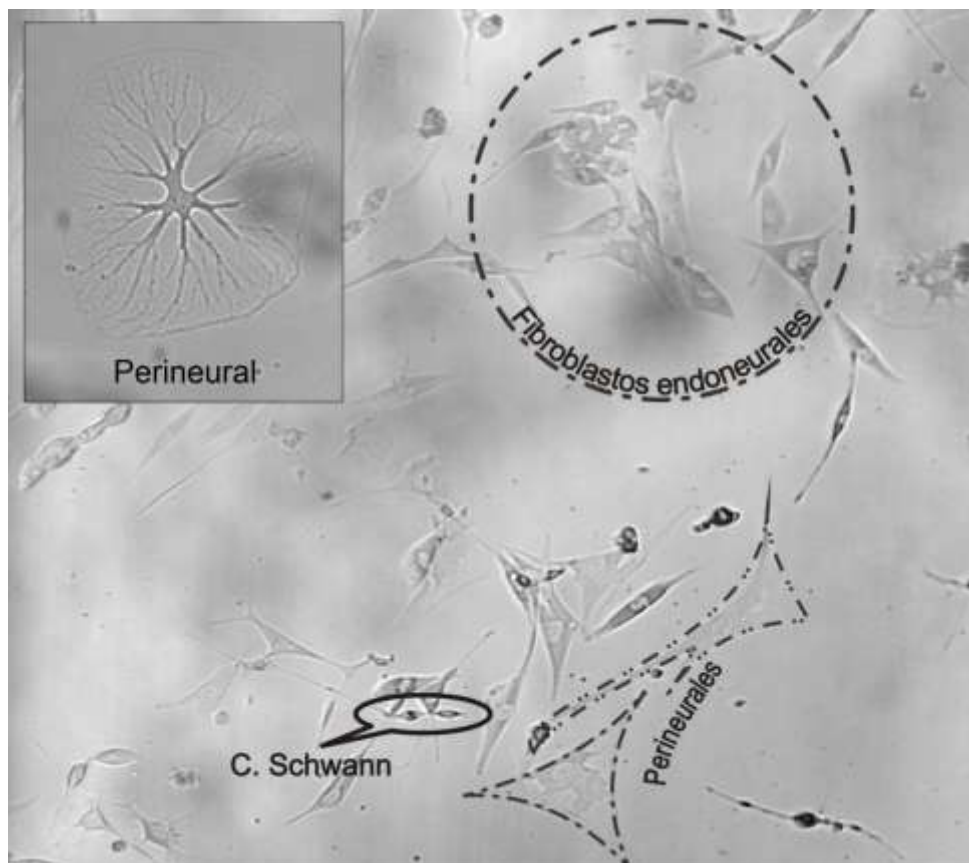
Algunas Investigaciones se han encaminado en el estudio de la bioquímica y fisiología de las células de Schwann (Sunderland S. 1985), especialmente para determinar qué factores influyen en la regeneración nerviosa periférica y cómo estas pueden ser una terapia contra enfermedades degenerativas como la esclerosis múltiple, pérdida de funcionalidad de los nervios y lesiones en el cerebro donde haya degeneración de las conexiones entre neuronas. Muchas prótesis incluyen células de Schwann obteniendo

⁷ Sección muy delgada de tejido embebida en parafina u otra resina.

mayor efectividad en los procesos regenerativos, sin embargo la purificación de estas células se obtiene después de 10 a 15 subcultivos (Yannas & Hill 2004, Salzer & Bunge 1980), que en tiempo llega a ser mayor a 45 días desde la extracción de los nervios. Otras técnicas van encaminadas a obtener células de Schwann a partir de embriones, pero como estas células no han terminado su proceso de especialización se utilizan factores de diferenciación lo cual hace que estos procesos sean muy caros y demoran alrededor de 15 a 20 días para obtener células de Schwann maduras (Jessen & Mirsky 2005, Mirsky *et al* 2002); esto se convierte en una dificultad para el desarrollo de terapias celulares, puesto que los procesos de cicatrización son más rápidos y suelen imponerse sobre la regeneración. (Vargas & Barres, 2007).

2.1.2 Forma

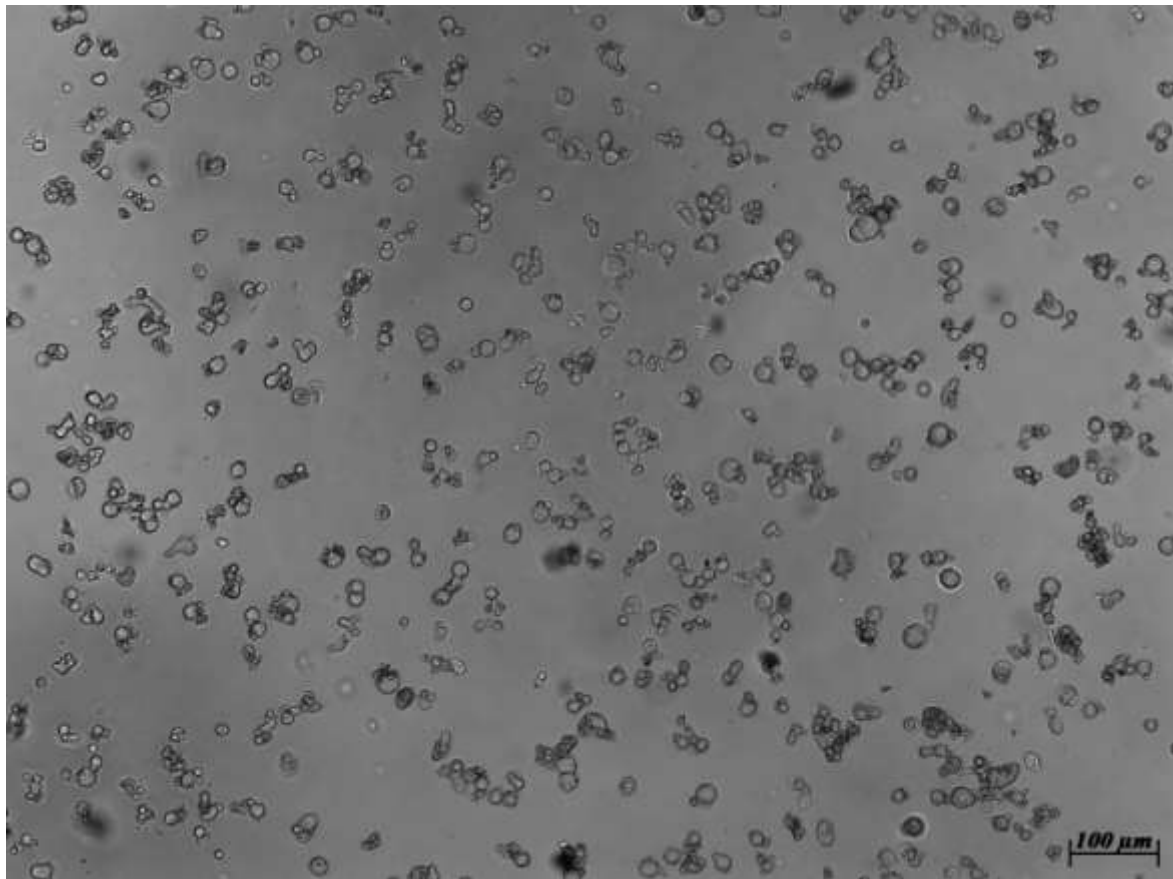
Figura 2-3: Cultivo adherido de células de Schwann (magnificación 40X).



En un cultivo primario de células de Schwann existen tres poblaciones celulares: células de Schwann, fibroblastos endoneurales y células perineurales (Ochoa *et al.* 2010), que toman diferentes formas al adherirse en las cajas de cultivo. Las células de Schwann

toman una forma ovalada que les permite desarrollar dos procesos o prolongaciones en su membrana, por otro lado, los fibroblasto endoneurales presentan una forma triangular con tres prolongaciones y las células perineurales no tienen ninguna forma geométrica definida, pero desarrollan muchos procesos que generan redes complejas a su alrededor, como se ilustra en la Figura 2-3. El tamaño de estas células adheridas con sus procesos oscila entre $150\mu m - 250\mu m$ aproximadamente. Sin embargo, cuando estas poblaciones celulares se encuentran en suspensión su forma y tamaño cambian, adoptando en su mayoría formas esféricas con diferentes radios celulares (ver Figura 2-4).

Figura 2-4: Cultivo en suspensión de células de Schwann de 6 días.



Debido a esta característica, de tomar formas casi esféricas en suspensión, se eligió el cultivo primario de células de Schwann como modelo biológico para hacer la separación a través de la técnica SPLITT, puesto que al tener esta geometría se simplifican las ecuaciones matemáticas obtenidas al hacer un análisis físico del movimiento de las células en el canal.

2.1.3 Tamaño

Para determinar los tamaños en suspensión de las poblaciones celulares, primero se realizó un seguimiento, por medio de microscopía de luz, del tamaño de estas células en un cultivo en suspensión durante 7 días, con el objetivo de determinar el rango de tamaños, en el cual se encontraban las poblaciones celulares. Luego se hicieron conteos celulares, dentro del intervalo encontrado, a través de un contador de partículas Coulter Beckman Z2 (ver anexo B), para obtener los tamaños aproximados de las células.

Seguimiento de los tamaños

Para hacer este seguimiento se usó un cultivo celular de 2 días, al cual se le tomaron fotos durante 7 días con un microscopio invertido de fluorescencia de marca Zeiss para una magnificación de 10X. Después de esto, en las fotos obtenidas se midieron los tamaños de las poblaciones celulares con la ayuda del programa AxioVision Rel. 4.8.2, lo que permitió obtener el registro que se muestra a continuación (ver Figura 2-5 a la 2-11).

Figura 2-5: Tamaños celulares en un cultivo en suspensión de células de Schwann de 2 días.

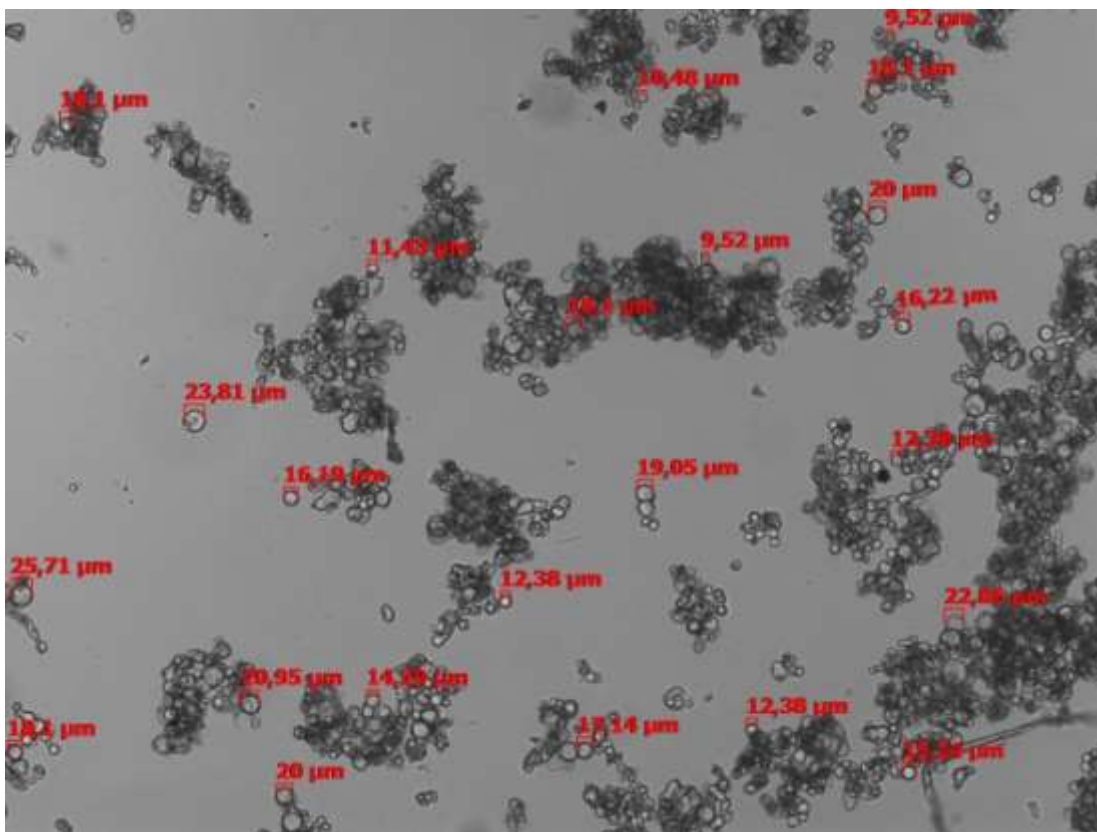


Figura 2-6: Tamaños celulares en un cultivo en suspensión de células de Schwann de 3 días.

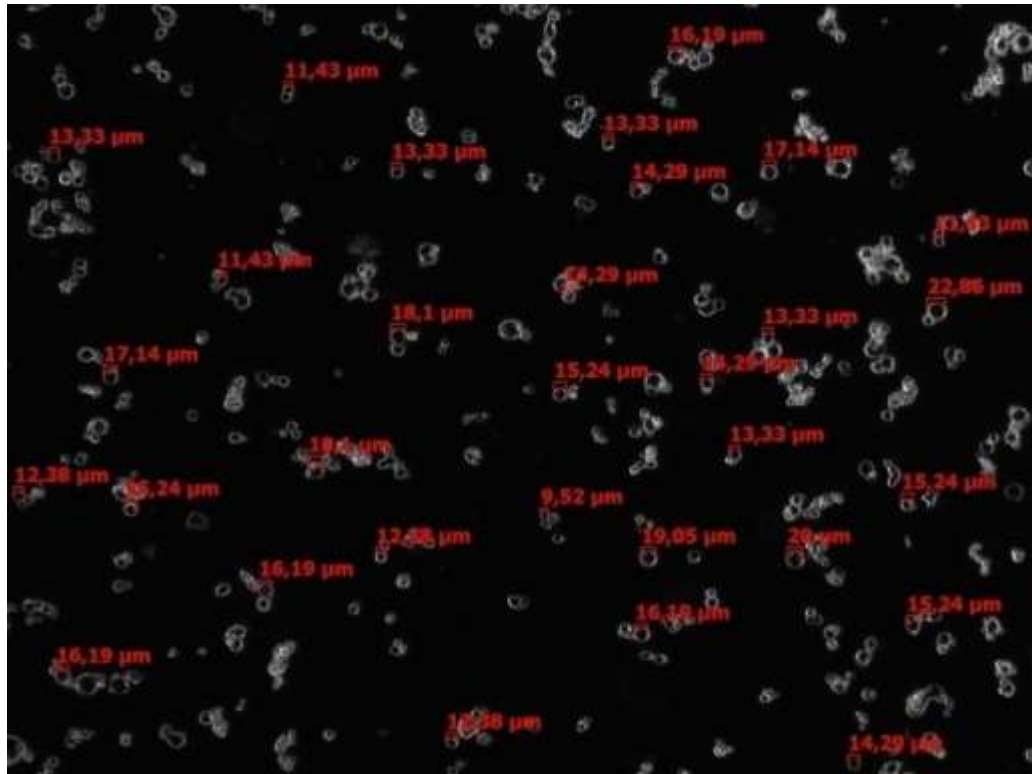


Figura 2-7: Tamaños celulares en un cultivo en suspensión de células de Schwann de 4 días.

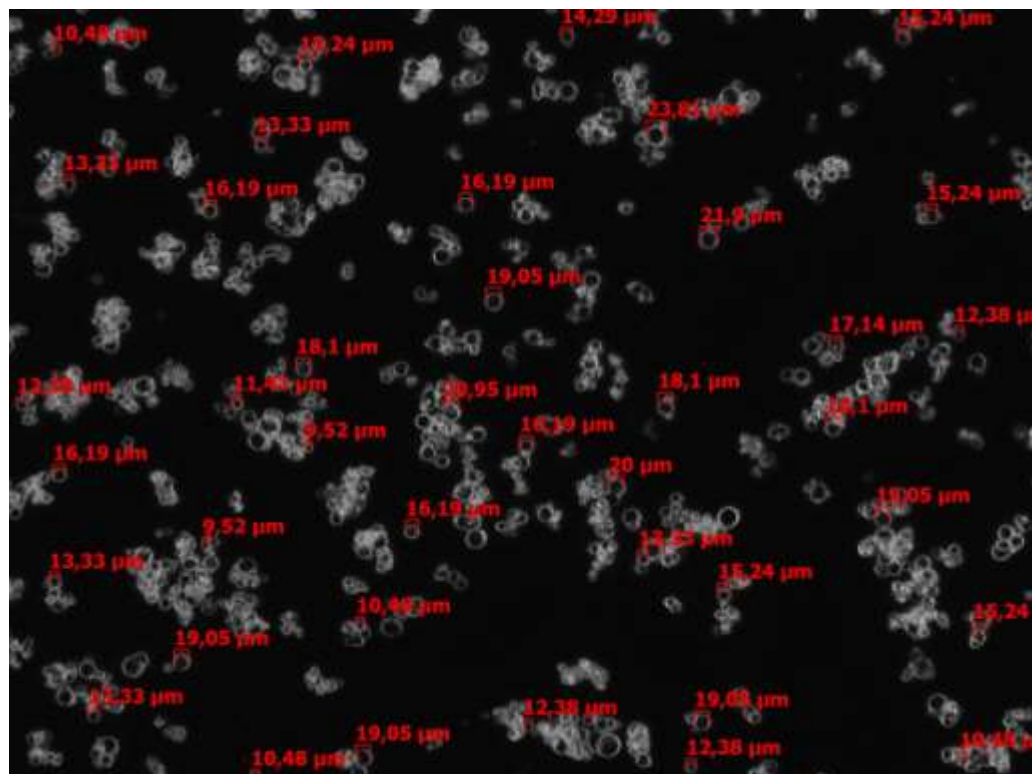


Figura 2-8: Tamaños celulares en un cultivo en suspensión de células de Schwann de 5 días.

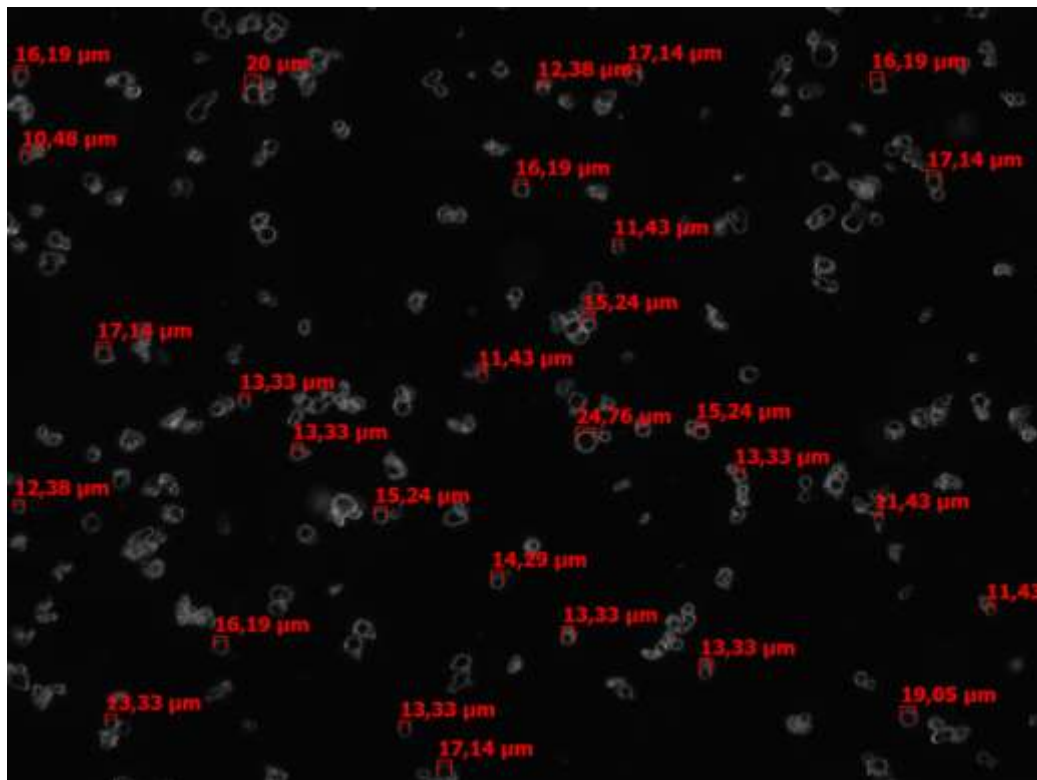


Figura 2-9: Tamaños celulares en un cultivo en suspensión de células de Schwann de 6 días.

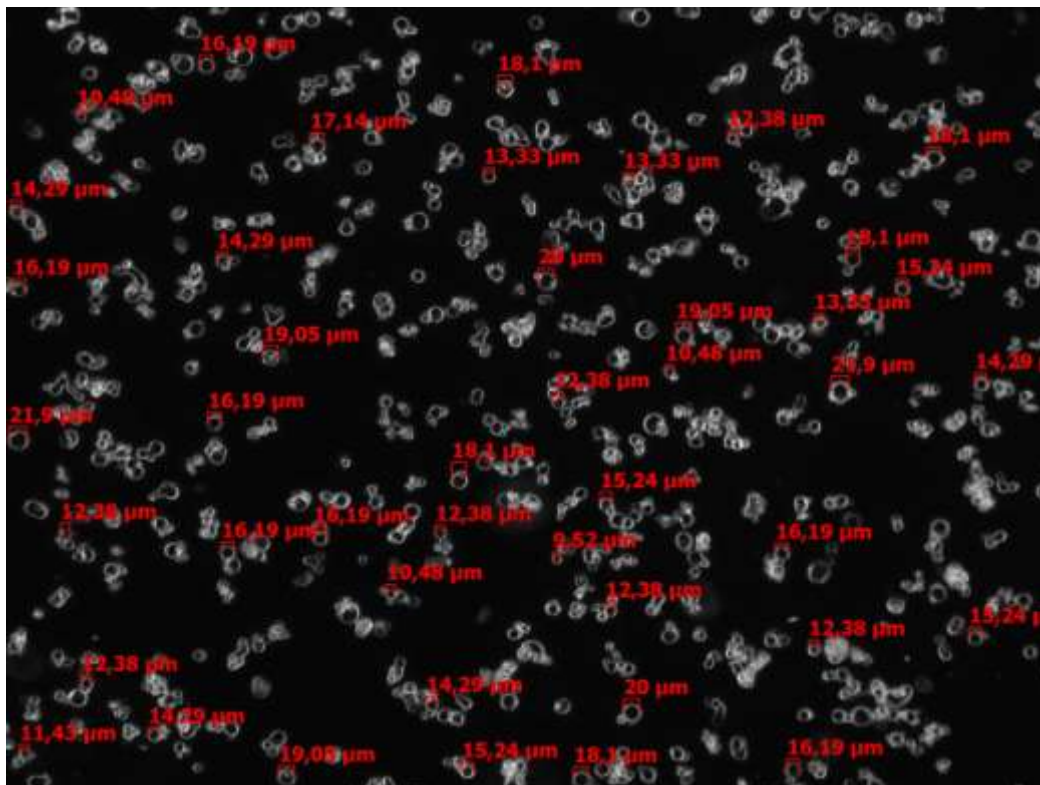


Figura 2-10: Tamaños celulares en un cultivo en suspensión de células de Schwann de 7 días.

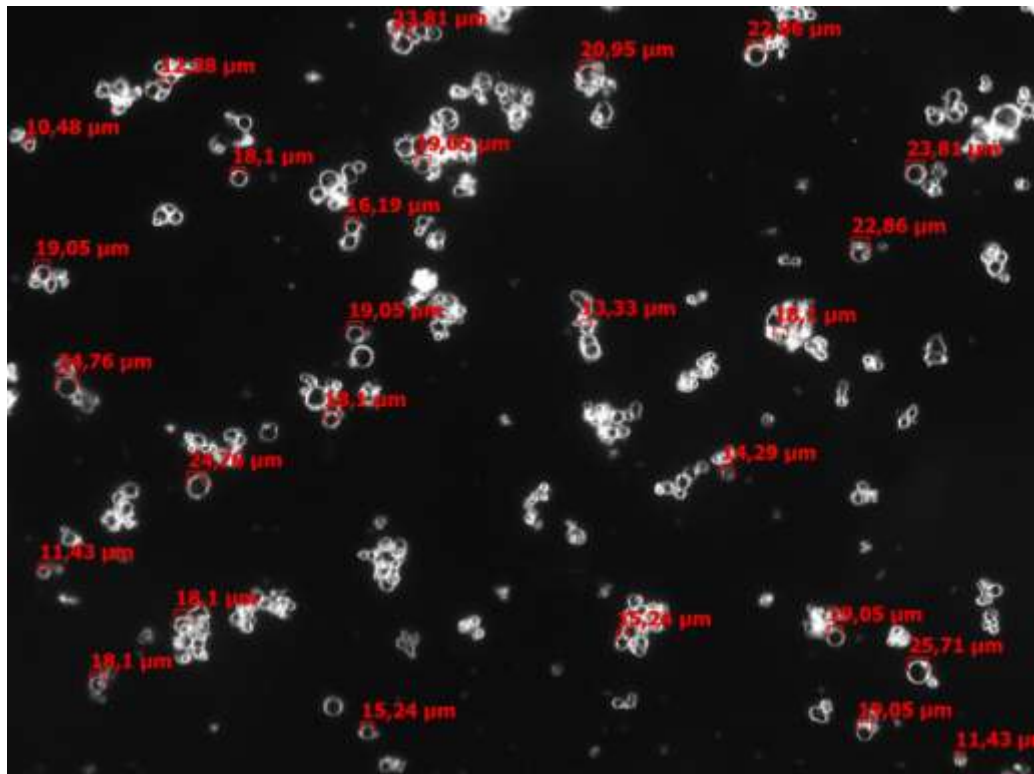
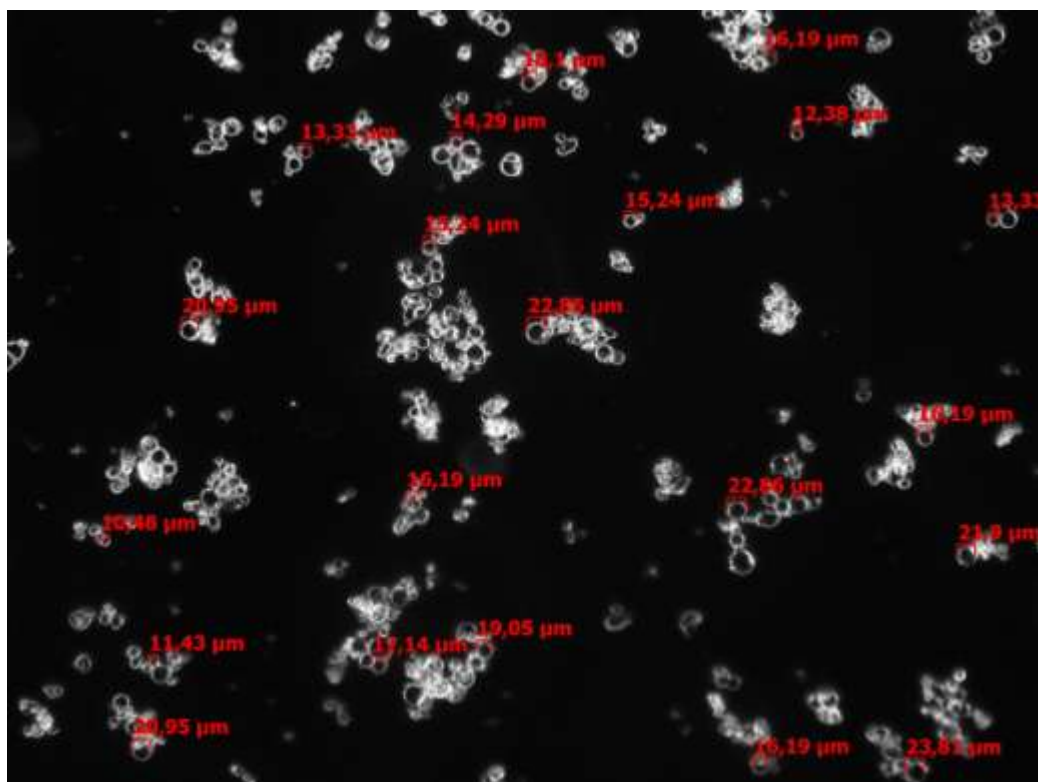


Figura 2-11: Tamaños celulares en un cultivo en suspensión de células de Schwann de 8 días.

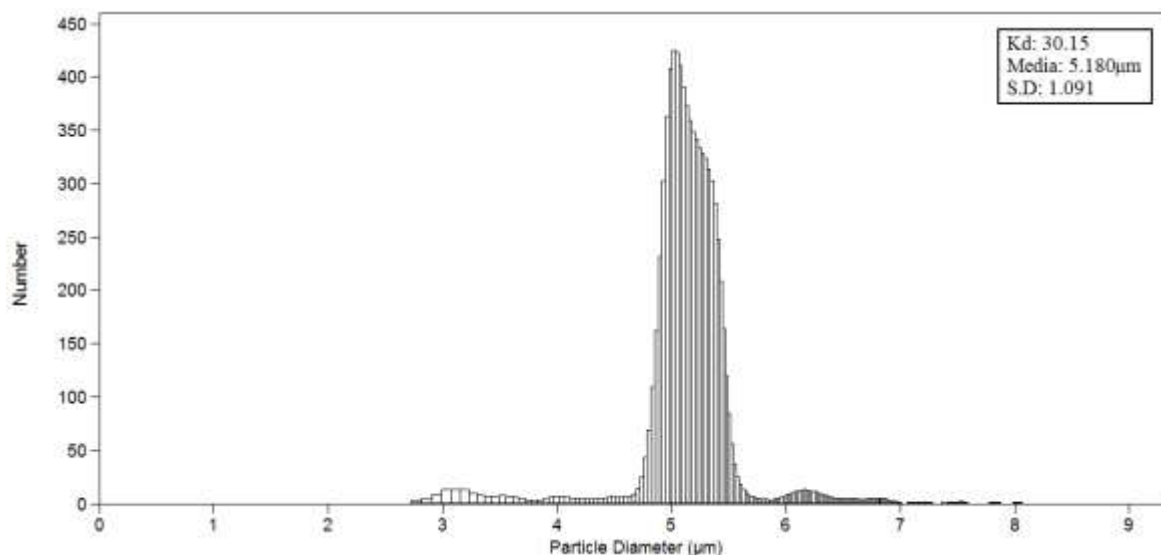


En este registro se observa claramente que los tamaños de las poblaciones celulares, que conforman este tipo de cultivo, se encuentran en su mayoría dentro de un rango de $9\mu m$ a $25\mu m$. Nótese, además, que en algunos días las células se encuentran muy agrupadas formando aglomerados como se ilustra en la Figura 2-5, mientras que en otros días estas se encuentran más individualizadas, ver Figura 2-9.

Conteo Celular

Como ya se mencionó para determinar los tamaños celulares se usó un contador Coulter Beckman Z2, con una apertura de $50\mu m$, el cual, primero fue calibrado utilizando partículas de Látex de $5\mu m$, con las que se obtuvo un Kd (diámetro de calibración constante) para esta apertura de ~ 30.15 (ver Figura 2-12).

Figura 2-12: Calibración del Coulter para una apertura de $50\mu m$.



Después de hacer la calibración del aparato, se tomó un cultivo de células de Schwann de 11 días con un pH ~ 6.9 , del cual se extrajeron $200\mu l$ de muestra, que fue adicionada a $10ml$ de PBS 1X estéril, para obtener una solución final con un volumen total de $10.2ml$; puesto que la concentración de la muestra, en esta solución, era bastante baja se configuró la apertura del Coulter para absorber un volumen de $\sim 0.5ml$ en cada medición. Teniendo la solución ya preparada y el equipo listo se hicieron conteos celulares, que según los tamaños observados con el microscopio deberían estar dentro

del rango de $9\mu m$ a $25\mu m$. Para este experimento se realizaron cuatro conteos dentro de los siguientes intervalos: $10\mu m - 21\mu m$, $9\mu m - 14\mu m$, $13\mu m - 18\mu m$ y $17\mu m - 25\mu m$.

En el primer conteo para el intervalo de $10\mu m - 21\mu m$, gráfica en negro Figura 2-13, se evidenció que en estos cultivos las células tienen, en su mayoría, tamaños muy homogéneos que no permiten identificar con claridad cuales son los tamaños promedio de las poblaciones celulares. Por lo que fue necesario, para identificar estos tamaños, suavizar la curva obtenida con el Coulter, gráfica en rojo Figura 2-13, y luego reconstruir está a partir de las curvas Gaussinas ilustradas en la Figura 2- 14.

Figura 2-13: Conteo de las poblaciones celulares en un cultivo de células de Schwann para un intervalo de $10\mu m - 21\mu m$. En negro se presenta el registro obtenido con el Coulter y en rojo se muestra el suavizado de esta curva.

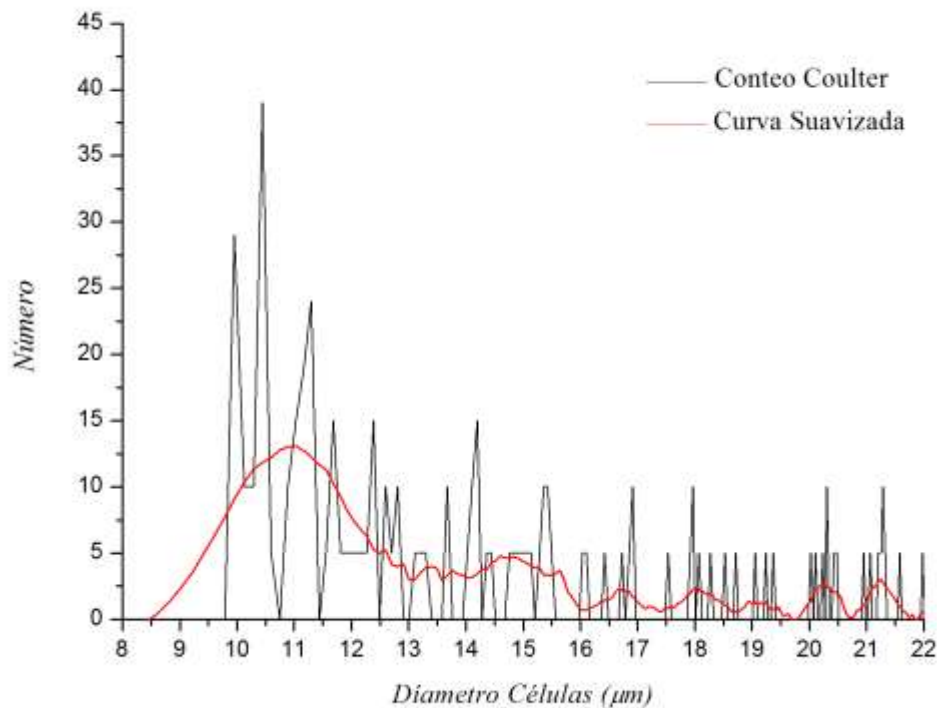
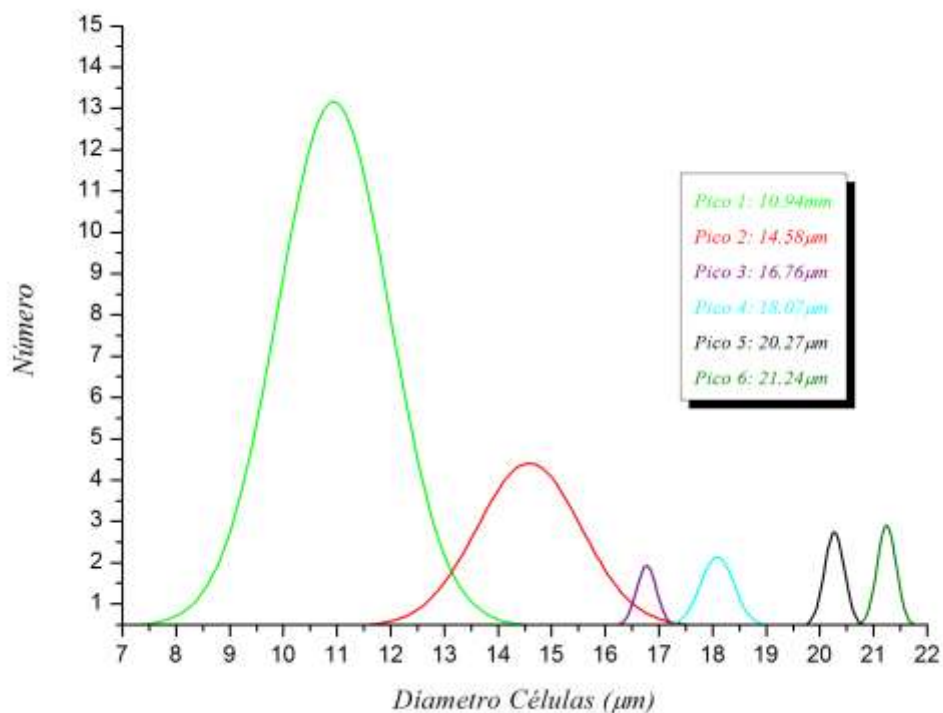


Figura 2-14: Tamaños de las poblaciones celulares en un cultivo de células de Schwann, para el intervalo de $10\mu\text{m} - 21\mu\text{m}$.



De la Figura 2-14, se concluye que dentro de un cultivo de células de Schwann existen aproximadamente seis o más poblaciones celulares de diferentes tamaños. Por tanto, los otros conteos fueron hechos agrupando estas poblaciones en tres intervalos según su tamaño: células de tamaño pequeño (de $9\mu\text{m}$ a $14\mu\text{m}$), células de tamaño mediano (de $13\mu\text{m}$ a $18\mu\text{m}$) y células de tamaño grande (de $17\mu\text{m}$ a $25\mu\text{m}$), lo cual permitió, con el mismo método usado para el intervalo de $10\mu\text{m}$ a $21\mu\text{m}$, determinar los tamaños aproximados de estos tres grupos celulares en el cultivo. Al hacer los conteos se logró establecer que los tamaños promedio de células pequeñas, medianas y grandes son $11.63\mu\text{m}$, $16.75\mu\text{m}$ y $22.71\mu\text{m}$ respectivamente (ver Figuras 2-15, 2-16 y 2-17). Pero a pesar de los resultados, no fue posible especificar cuál de estos tamaños correspondían a las células de Schwann, fibroblastos endoneurales y células perineurales, debió a que todas estas poblaciones celulares tomaron forma esférica en suspensión, como se mencionó anteriormente, lo que hizo imposible su identificación por morfología.

Figura 2-15: Tamaños de las células pequeñas en un cultivo de células de Schwann, representados por Gaussianas para un conteo dentro del intervalo de $9\mu\text{m} - 14\mu\text{m}$.

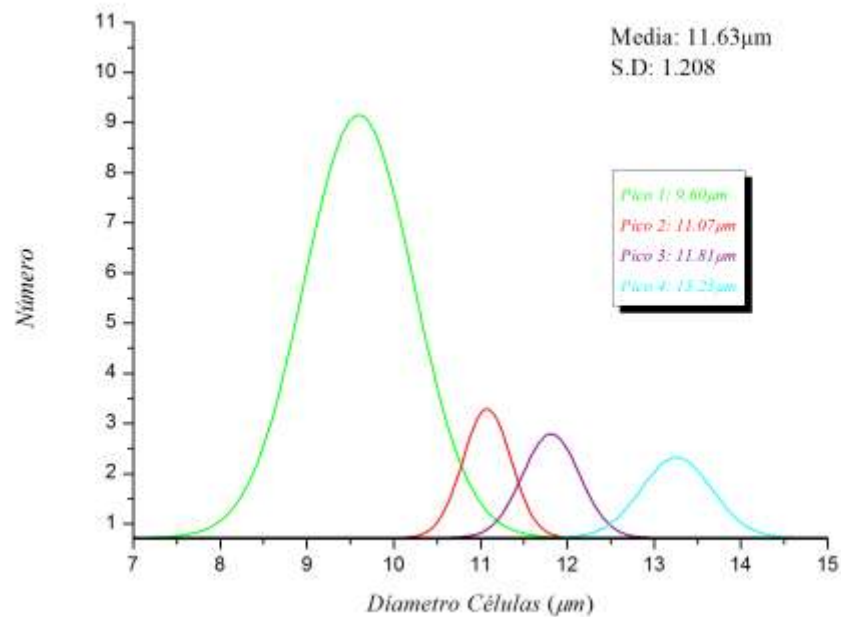


Figura 2-16: Tamaños de las células medianas en un cultivo de células de Schwann, representados por Gaussianas para un conteo dentro del intervalo de $13\mu\text{m} - 18\mu\text{m}$.

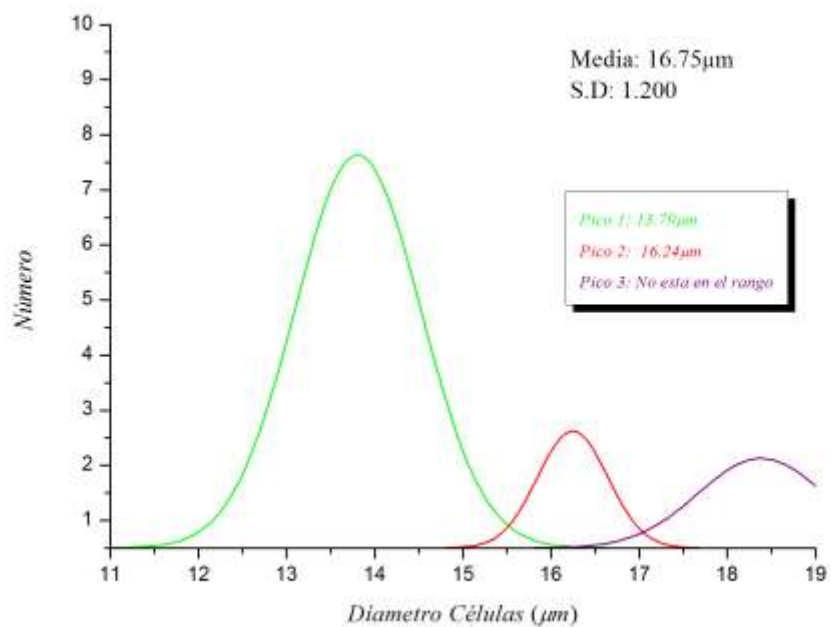
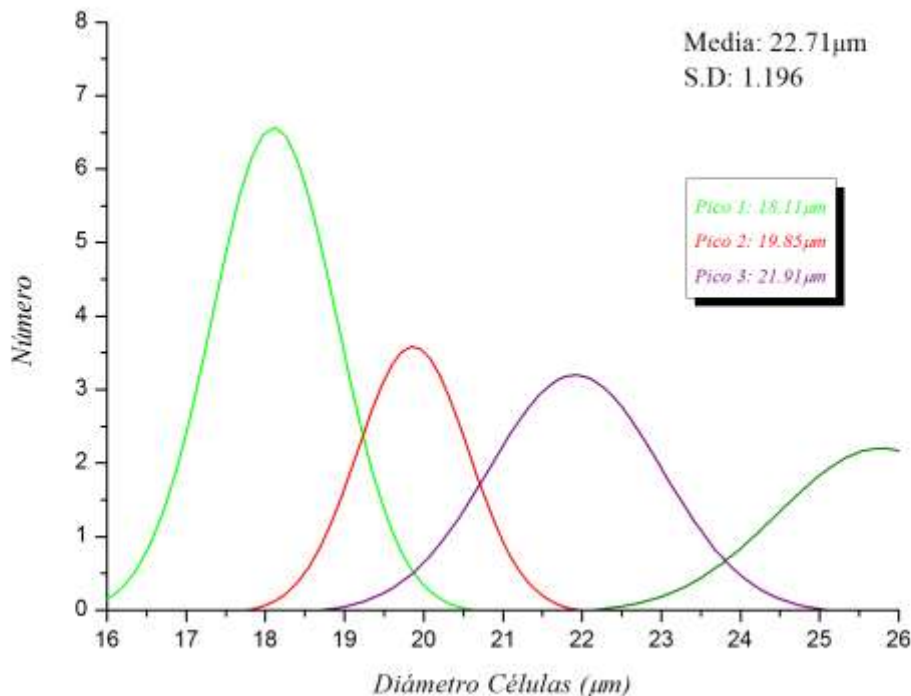


Figura 2-17: Tamaños de las células grandes en un cultivo de células de Schwann, representados por Gaussianas para un conteo dentro del intervalo de $17\mu m - 25\mu m$.



2.1.4 Densidad

La densidad de las células en el cultivo fue determinada a partir de una técnica conocida como gradientes de densidad en la que se usa un colide, en este caso Percoll⁸, para determinar por centrifugación el punto isopícnico⁹ de las células. Esta consiste en construir gradientes al utilizar soluciones con diferentes densidades (densidad deseada ρ_{des}), las cuales se obtienen al mezclar dos sustancias de densidad conocida, en este

⁸ El Percoll es un coloide polidisperso compuesto de partículas de sílice con tamaños que oscilan entre 15 a $30nm$. Su densidad es de $\sim 1,130 \pm 0,005 \frac{g}{ml}$ y su pH a una temperatura de $20^{\circ}C$ es $\sim 9,0 \pm 0,5$ (Amersham Biosciences, 2007).

⁹ Es la posición de equilibrio alcanzada por una célula cuando su densidad es igual a la densidad de la capa en el gradiente (Amersham Biosciences, 2007).

caso medio de cultivo celular o NaCl 0.15M, ρ_{med} , y solución isotónica de Percoll (SIP)¹⁰, ρ_{SIP} , que tienen dos porcentajes de volumen diferentes, V_{med} y V_{SIP} , que han sido especificados para un volumen de solución final, V_{total} , establecido con anterioridad. Es decir, que para una solución final con un volumen total, V_{total} , y densidad deseada, ρ_{des} , se encuentran el volumen de medio de cultivo, V_{med} , y de SIP, V_{SIP} , que se deben usar para obtener esta solución final con la densidad especificada (ver Ecuaciones (2.1) y (2.2)).

$$V_{med} = V_{total} \left(\frac{\rho_{SIP} - \rho_{des}}{\rho_{SIP} - \rho_{med}} \right) \quad (2.1)$$

$$V_{SIP} = V_{total} - V_{med} \quad (2.2)$$

Al tener listas las soluciones con diferentes densidades, se toman $\sim 200\mu l$ de cada una y se sirven por capas en dos tubos eppendorff de 2ml para construir en ellos dos gradientes, iguales, con las densidades deseadas. Después, encima de la última capa, se deposita en uno de los tubos $\sim 200\mu l$ del cultivo celular y en el otro $\sim 200\mu l$ de una mezcla de perlas marcadoras de densidad¹¹, se cierran y se introducen en una centrifuga donde se centrifugan a $\sim 250g$ durante 30min, al terminar este tiempo los tubos son sacados de la centrifuga y se miden las distancias de las capas formadas en su interior, por las células y perlas marcadoras, con respecto a la parte inferior de los tubos. Por último los datos de las densidades de las perlas marcadoras y las distancias medidas a cada capa, son colocados en un plano al que se le hace una regresión lineal, a través de la cual se determina la densidad aproximada de la capa de células formada.

En el caso de cultivos de células de Schwann se encontró experimentalmente, para los primeros días de cultivo, que las densidades de las células están dentro del intervalo $1,01 \frac{g}{cm^3} \leq \rho_{cel} \leq 1,03 \frac{g}{cm^3}$. Por tal motivo los resultados experimentales, de los dos gradientes que se muestran a continuación, se obtuvieron dentro de este intervalo.

¹⁰ La SIP fue hecha al adicionar 9 partes (V/V) de Percoll a 1 parte (V/V) de NaCl 1.5M, por lo que se obtiene una $\rho_{SIP} = 1,123 \frac{g}{ml}$ (Amersham Biosciences, 2007).

¹¹ En estos experimentos se uso el kit Density Marker Bead, DMB -10 de Sigma.

Gradiente de Densidad 1

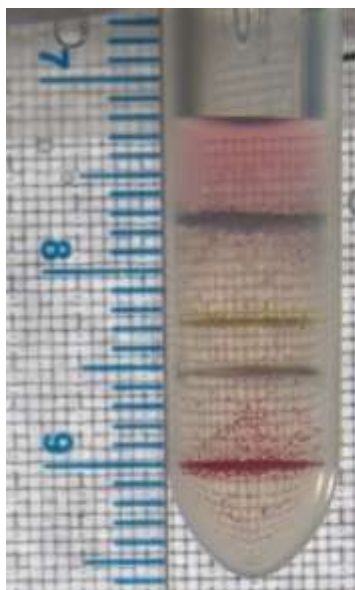
En este experimento se usó un cultivo celular de dos días, para el cual se construyó un gradiente de densidad de ocho capas usando RPMI y NaCl 0.15M como medios de dilución de la SIP; con lo que se obtuvo, para soluciones finales de 1ml, al mezclar los volúmenes de medio y SIP, las densidades mostradas en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Densidades de las soluciones usadas en el gradiente 1.

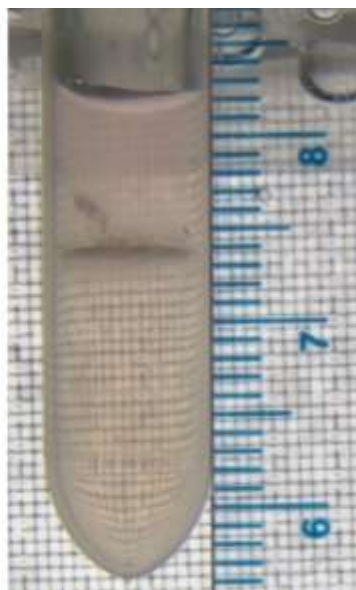
Capa	Medio de dilución	$\rho_{des} (g/cm^3)$	$V_{med} (ml)$	$V_{SIP}(ml)$
1	NaCl	1,010	0,954	0,046
2	RPMI	1,020	0,876	0,124
3	NaCl	1,030	0,785	0,215
4	RPMI	1,035	0,748	0,252
5	NaCl	1,040	0,701	0,299
6	RPMI	1,050	0,621	0,379
7	NaCl	1,060	0,532	0,468
8	RPMI	1,070	0,451	0,549

Al construir los gradientes para estas densidades y centrifugar con las condiciones mencionadas anteriormente, se obtuvo una sola capa de células, ver Figura 2-18.

Figura 2-18: Capas, de perlas marcadoras y células, obtenidas con el gradiente de densidad 1.



Perlas Marcadoras



Células de Schwann

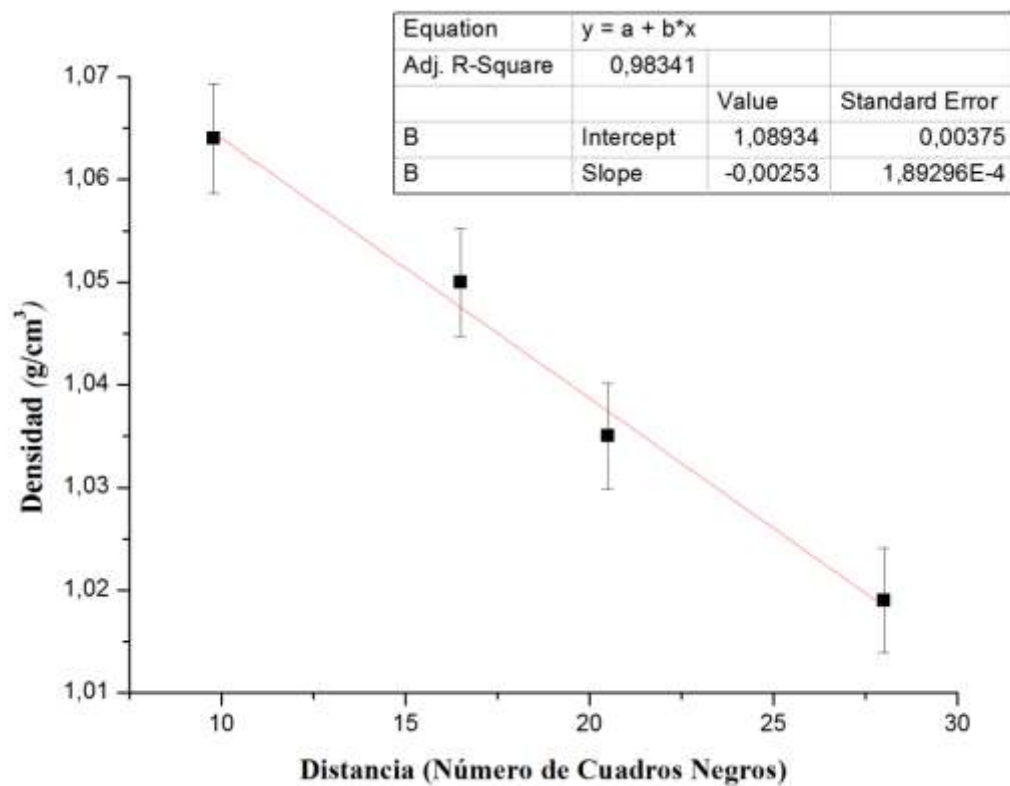
Ahora, midiendo las posiciones, usando la cuadrícula negra y la regla mostradas en la Figura 2-18, se determinan las distancias a cada una de las capas formadas (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Distancias medidas a cada capa obtenida.

Capa formada	Densidad (g/cm^3)	Cuadrícula fondo (cuadros)	Distancia Regla (cm)
Roja	1,064	$9,8 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,05$
Blancas	1,050	$16,5 \pm 0,5$	$1,05 \pm 0,05$
Amarilla	1,035	$20,5 \pm 0,5$	$1,32 \pm 0,05$
Azul	1,019	$28 \pm 0,5$	$1,86 \pm 0,05$
Células de Schwann	$\dot{?}$	$26,3 \pm 0,5$	$1,84 \pm 0,05$

Haciendo la regresión lineal de los datos mostrados en la Tabla 2-2 (Figura 2-19).

Figura 2-19: Regresión lineal para el gradiente de células número 1.



Y por último, escribiendo la ecuación de esta línea recta, en la forma:

$$f(x) = -0,00253x + 1,08934 \quad (2.3)$$

Donde $f(x)$ representa la densidad y x la distancia medida a cada una de las capas formadas. Se puede encontrar, para $x = 26,3$ cuadros (ver Tabla 2-2), que la densidad de las células es:

$$\rho_{cel} \approx 1,0228 \frac{g}{cm^3} \quad (2.4)$$

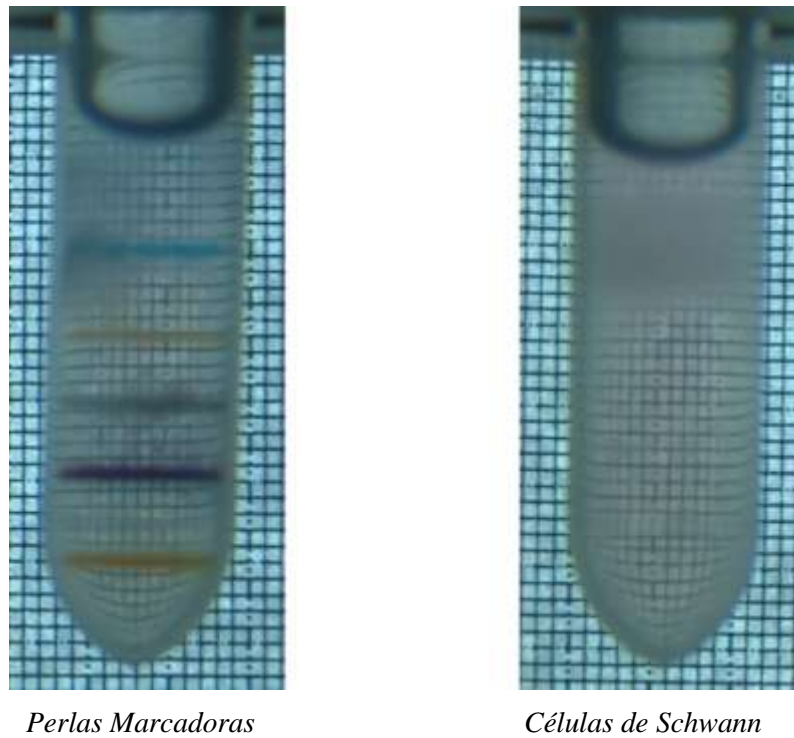
Gradiente de Densidad 2

En este experimento a diferencia del anterior se usó un cultivo celular de 8 días, al cual se le agrego 320und de colagenasa más 1und de dispasa por ml , en las que se mantuvo el cultivo durante 30 minutos, con el propósito de disociar los cúmulos celulares, para individualizar las células. Luego de este tratamiento enzimático, se construyó un gradiente de 10 capas usando nuevamente RPMI y NaCl 0.15M como medios de dilución de la SIP, que para soluciones finales con un volumen de $1ml$, permitieron obtener las densidades mostradas en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3: Densidades de las soluciones usadas en el gradiente 2.

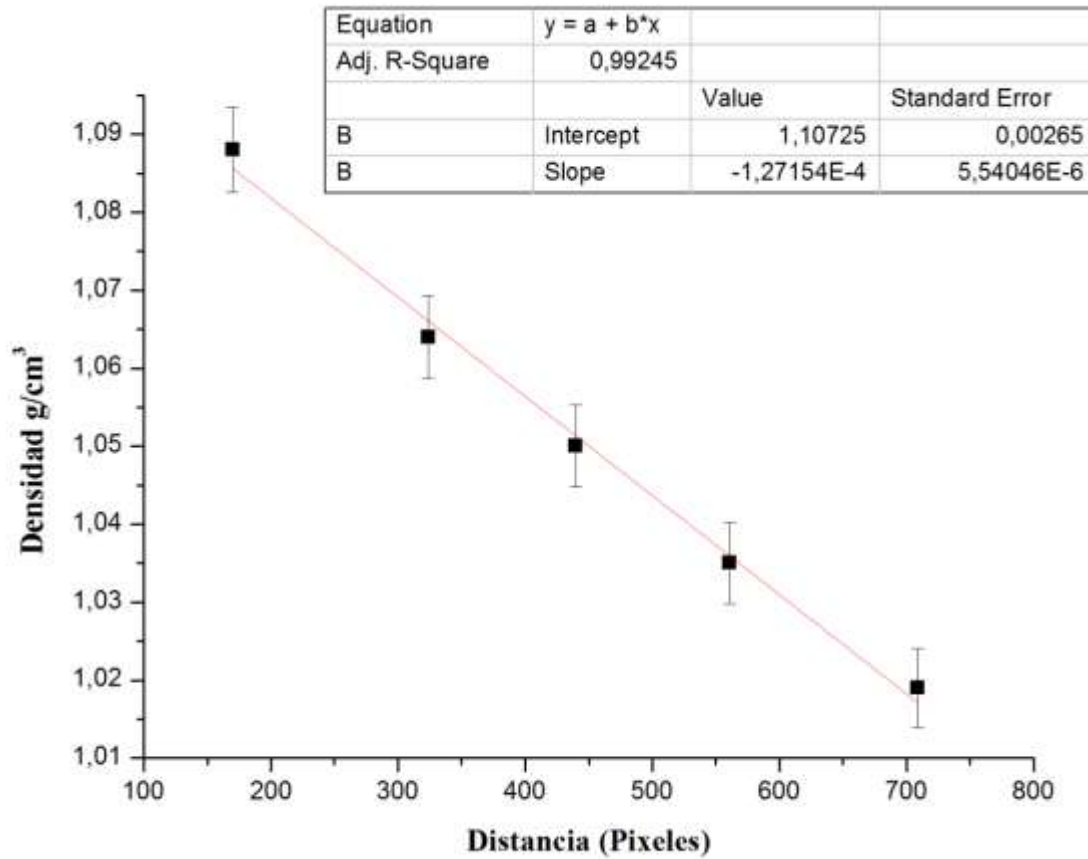
Capa	Medio de dilución	$\rho_{des} (g/cm^3)$	$V_{med} (ml)$	$V_{SIP}(ml)$
1	NaCl	1,010	0,954	0,046
2	RPMI	1,020	0,873	0,127
3	NaCl	1,030	0,785	0,215
4	RPMI	1,035	0,746	0,254
5	NaCl	1,040	0,701	0,299
6	RPMI	1,050	0,619	0,381
7	NaCl	1,060	0,532	0,468
8	RPMI	1,070	0,449	0,551
9	NaCl	1,080	0,363	0,637
10	RPMI	1,090	0,280	0,720

Al centrifugar los gradientes se obtuvo, en este caso, dos capas de células muy juntas, como se ilustra en la Figura 2-20. Midiendo nuevamente la distancia a cada una de estas capas se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 2-4.

Figura 2-20: Capas, de perlas marcadoras y células, obtenidas con el gradiente de densidad 2.**Tabla 2-4:** Distancias medidas a cada capa.

Capa	Densidad (g/cm^3)	Distancia Cuadrícula (cuadros)	Distancia Regla (cm)	Distancia (Píxeles)
Naranja	1,088	$6 \pm 0,5$	$0,62 \pm 0,05$	$170 \pm 0,5$
Morada	1,064	$11,5 \pm 0,5$	$1,15 \pm 0,05$	$324 \pm 0,5$
Blanca	1,050	$15,7 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,05$	$440 \pm 0,5$
Amarilla	1,035	$19,9 \pm 0,5$	$1,99 \pm 0,05$	$561 \pm 0,5$
Azul Clara	1,019	$25,2 \pm 0,5$	$2,52 \pm 0,05$	$709 \pm 0,5$
Células de Schwann (Capa inferior)	¿?	$25,2 \pm 0,5$	$2,45 \pm 0,05$	$704 \pm 0,5$
Células de Schwann (Capa superior)	¿?	$28,7 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,05$	$792 \pm 0,5$

Haciendo de nuevo una regresión lineal, pero ahora para los datos en la Tabla 2-4 (ver Figura 2-21).

Figura 2-21: Regresión lineal de los datos mostrados en la Tabla 2-4.

Se obtiene la ecuación de la recta:

$$f(x) = -1,27154 \times 10^{-4}x + 1,10725 \quad (2.5)$$

Donde se encuentra, si $x = 792 \text{ píxeles}$ y $x = 704 \text{ píxeles}$ (ver Tabla 2-4), que la densidad para la capa superior e inferior de células, ρ_{cel1} y ρ_{cel2} respectivamente, son:

$$\rho_{cel1} \approx 1,006 \frac{g}{cm^3} \quad (2.6)$$

$$\rho_{cel2} \approx 1,017 \frac{g}{cm^3} \quad (2.7)$$

Midiendo los tamaños de las células en cada capa se puede notar que en la capa superior se encuentran las células de mayor diámetro (ver Figura 2-22), mientras que en la capa inferior están las células de menor diámetro (ver Figura 2-23).

Figura 2-22: Diámetros de las células en la capa superior.

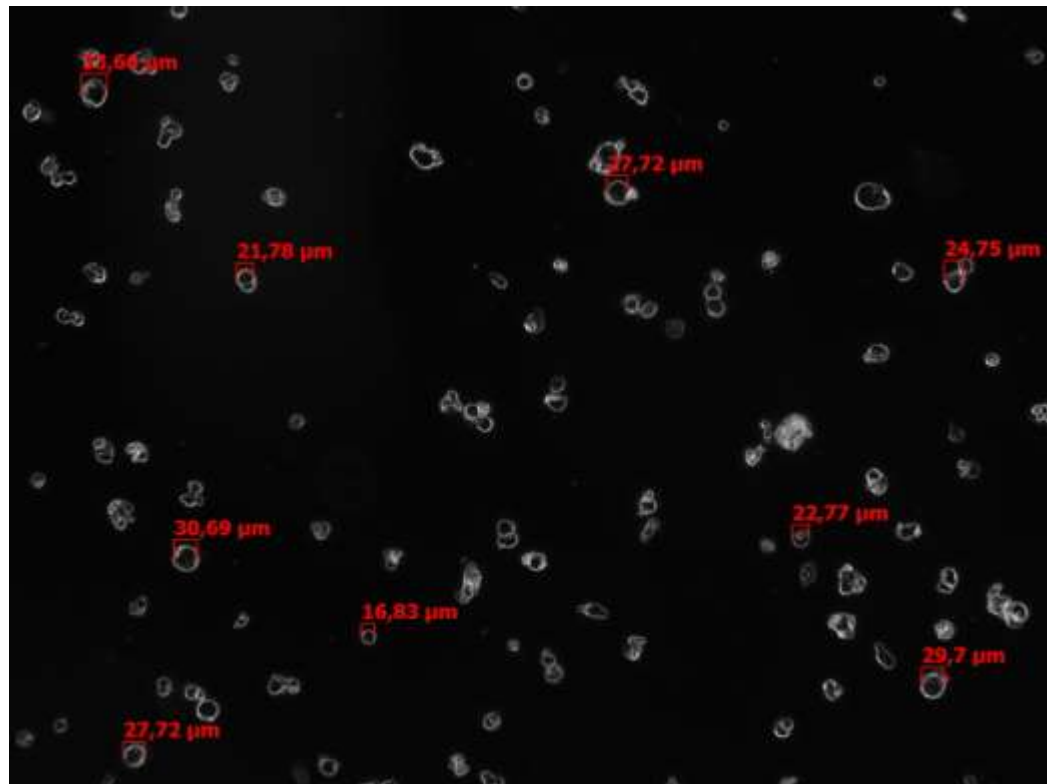
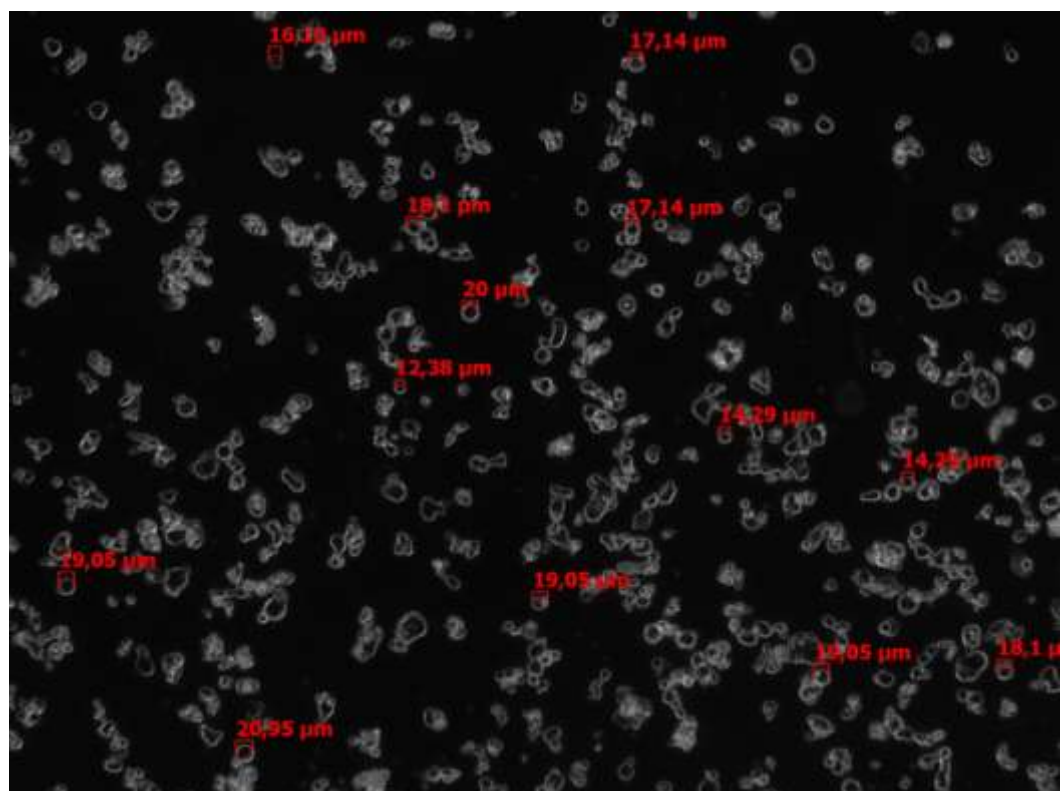


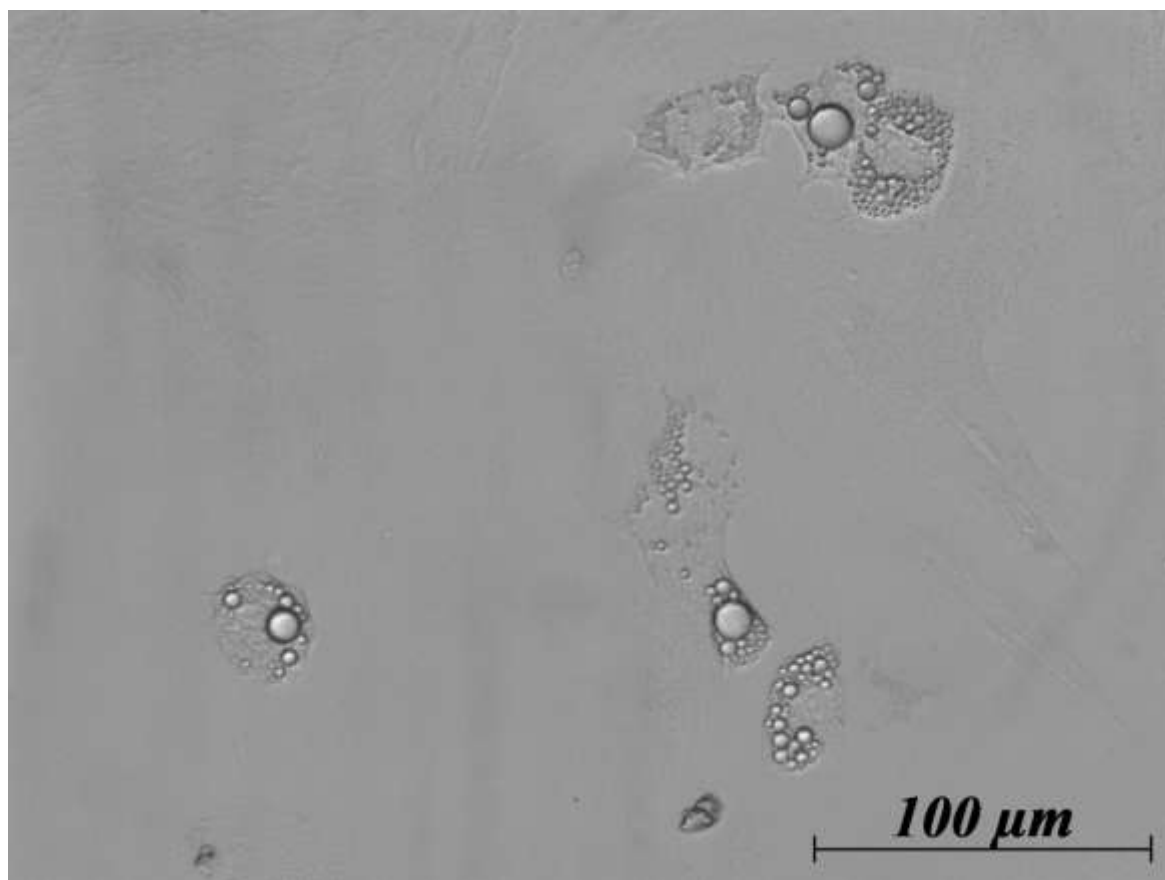
Figura 2-23: Diámetros de las células en la capa inferior.



Hasta aquí se han presentado los resultados obtenidos de los gradientes de Percoll, a través de los cuales se logró establecer experimentalmente tres densidades diferentes para las células en un cultivo de nervio ciático, (ver Ecuaciones (2.4), (2.6) y (2.7)), que pueden ser interpretadas como la densidad de cúmulos celulares (ver Ecuación (2.4)), similares a los mostrados en la Figura 2-5, y la densidad de las células de menor diámetro (ver Ecuación 2.7) y de las células de mayor diámetro (ver Ecuación 2.6).

Para terminar esta sub-sección es importante resaltar que si bien con los gradientes de Percoll se pudo separar, en dos grupos celulares de diferentes diámetros, un cultivo de células de Schwann, ver Figura 2-20. La recuperación de estas células separadas con Percoll y su mantenimiento en cultivo hasta que se adhirieran nuevamente, permitió evidenciar que el Percoll es fagocitado por estas como se ilustra en la Figura 2-24.

Figura 2-24: Cultivo de células de Schwann de 25 días, recuperado después de separación con Percoll.



2.2 Propiedades Físicas del Fluido

2.2.1 Fluidos Usados en la Separación

Como fluido en la separación de las especies celulares, se usó medio de cultivo celular, el cual permite mantener la viabilidad y fisiología de las células durante el proceso de separación. Puesto que estos medios son soluciones de sales, aminoácidos y glucosa que se suplementan con suero fetal bovino (SFB), Glutamina¹², bicarbonato de sodio¹³ y HEPES¹⁴ es posible que su densidad y viscosidad varíen con respecto a la del agua, por lo tanto, a continuación se presentan para los medios RPMI 1640 y DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) los resultados obtenidos al medir experimentalmente estas dos propiedades físicas.

2.2.2 Densidad

Figura 2-25: Procedimiento para calcular la densidad de los medios.



Picnómetro con Medio

Picnómetro con Agua

¹² Es la fuente de carbono de las células que permite su crecimiento.

¹³ Equilibra el pH del medio.

¹⁴ Mantiene el pH del medio de cultivo constante, entre 7.1-7.2 que es el rango fisiológico.

Para encontrar la densidad de los medios de cultivo se uso un picnómetro de la marca Bland Brand Duran DIN, con un volumen de $25,341 \pm 0,005 \text{ cm}^3$, el cual, fue pesado vacío con una balanza digital Mettler AE100; luego se pesó este nuevamente lleno de agua destilada y por último se pesó lleno con medio de cultivo celular como se ilustra en la Figura 2-25.

A las medidas tomas con la balanza para el agua destilada y para el medio de cultivo, se les descontó la masa del picnómetro vacío, $m_{pic} = 20,3986 \pm 0,0005g$, con lo que se obtuvieron los valores de las masas mostrados en la Tabla 2-5.

Tabla 2-5: Masas del agua destilada y los medios de cultivo.

Fluido	Temperatura	Masa
Agua destilada	20,0°C	$25,2393 \pm 0,0005g$
RPMI	19,2°C	$25,4796 \pm 0,0005g$
		$25,4783 \pm 0,0005g$
DMEM	20,0°C	$25,5336 \pm 0,0005g$
		$25,5396 \pm 0,0005g$

Ya que las masas del agua destilada y del medio de cultivo fueron medidas usando el mismo volumen, entonces al igualar el volumen del agua con el del medio se llega a:

$$\rho_{medio} = \frac{m_{med}}{m_{agua}} \rho_{agua} \quad (2.8)$$

Donde la densidad del agua destilada, a una temperatura de 20,0°C, es $\sim 0,9959 \frac{g}{cm^3}$.

Usando la ecuación (2.8) para los valores de la Tabla 2-5, se obtiene que:

$$\rho_{RPMI} \approx 1,0053 \pm 0,0005 \frac{g}{cm^3} \quad (2.9)$$

$$\rho_{DMEN} \approx 1,0076 \pm 0,0005 \frac{g}{cm^3} \quad (2.10)$$

2.2.3 Viscosidad

En la medición de la viscosidad de los medios de cultivo se usó un viscosímetro RV20 HOTOVISCO HAAKE¹⁵ facilitado por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, el cual constaba de dos cilindros coaxiales, en medio de los cuales se introducían los fluidos, que eran deformados por la acción de una fuerza tangencial a su superficie o esfuerzo cortante τ generado por la rotación del cilindro interno, lo que daba como resultado, la formación de un gradiente de velocidades D en el interior de los medios de cultivo celular (perfil de velocidades). Esto permitió para diferentes gradientes de velocidad D determinar los valores del esfuerzo cortante τ sobre el RPMI y el DMEM, Tabla 2-6 y Tabla 2-7.

Tabla 2-6: Esfuerzos cortantes y gradientes de velocidad medidos para el DMEM a una temperatura de 20,0°C.

Gradiente de velocidad $D \left(\frac{1}{s} \right)$	Esfuerzo cortante $\tau \left(\frac{N}{m^2} \right)$
27	0,0534
45,9	0,0712
75,6	0,1246
126,9	0,1602
207,9	0,2492
348,3	0,3916
583,5	0,6942
969,3	1,1748
1620	1,9936
2700	3,8448

¹⁵ Para una descripción más detallada de los principios físicos de este viscosímetro consultar Hibberd F.H. 1952.

Tabla 2-7: Esfuerzos cortantes y gradientes de velocidad medidos para el RPMI a una temperatura de 20,7°C.

Gradiente de velocidad $D \left(\frac{1}{s} \right)$	Esfuerzo cortante $\tau \left(\frac{N}{m^2} \right)$
27	0,0712
45,9	0,089
75,6	0,1246
126,9	0,178
207,9	0,267
348,3	0,4094
583,5	0,712
969,3	1,157
1620	1,958
2700	3,8448

Recordando que para un fluido newtoniano el gradiente de velocidad D es proporcional al esfuerzo cortante τ , lo cual puede ser expresado por la relación lineal:

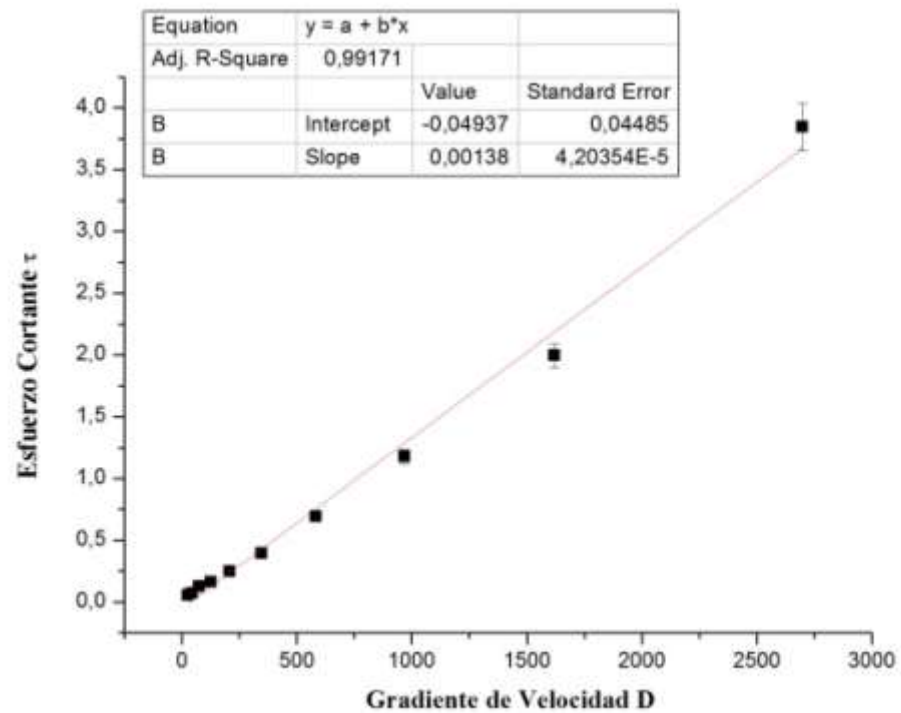
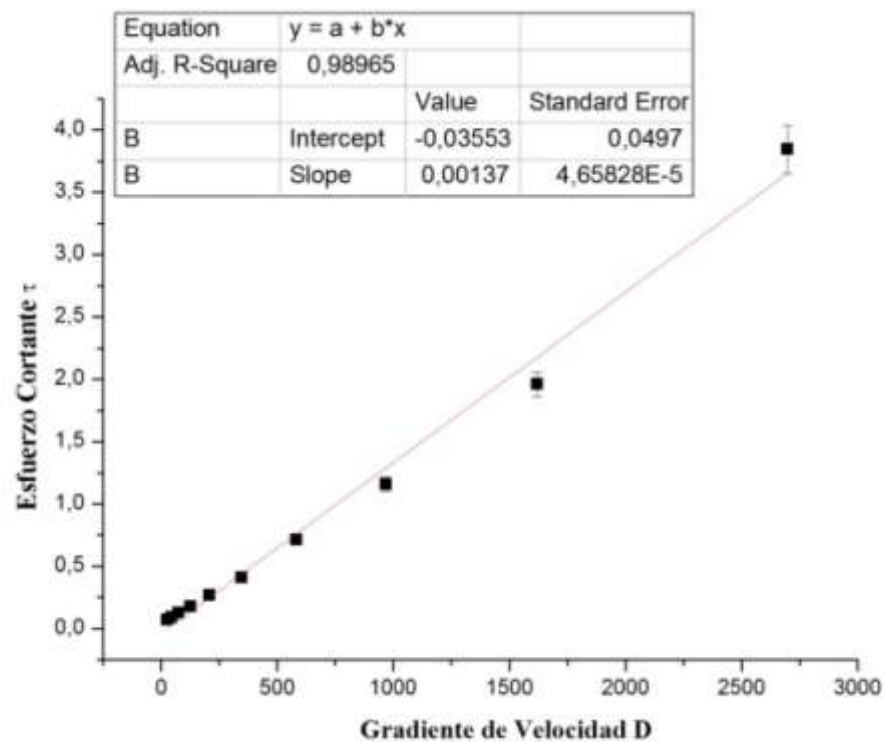
$$\tau = \eta D \quad (2.11)$$

Donde la constante de proporcionalidad η es llamada coeficiente de viscosidad o viscosidad dinámica del fluido (Cengel & Cimbala 2006). Entonces, a partir de las regresiones lineales de los datos mostrados en las Tablas 2-6 y 2-7, se observó, como se ilustra en las Figuras 2-26 y 2-27, que el RPMI y el DMEM cumplen con la relación lineal (2.11), es decir, que se comportan como un fluido newtoniano.

Por lo tanto, al encontrar las pendientes de las líneas rectas ilustradas en las Figuras 2-26 y 2-27, fue posible determinar experimentalmente que los valores de la viscosidad dinámica η para cada uno de los medios usados son:

$$\eta_{DMEM} \cong 1,38 \times 10^{-3} \frac{Kg}{ms} \quad (2.12)$$

$$\eta_{RPMI} \cong 1,37 \times 10^{-3} \frac{Kg}{ms} \quad (2.13)$$

Figura 2-26: Ajuste lineal de los datos mostrados en la Tabla 2-6, para el DMEM.**Figura 2-27:** Ajuste lineal de los datos mostrados en la Tabla 2-7, para el RPMI.

Con estos valores de la viscosidad dinámica para los medios de cultivo RPMI 1640 y el DMEM, se da por terminado este capítulo, en el cual se mostraron los resultados experimentales obtenidos al medir las propiedades físicas de las células y el fluido, resumidas en la Tabla 2-8, necesarias para separar las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann por medio de la técnica SPLITT acoplada únicamente a un campo gravitacional.

Tabla 2-8: Propiedades físicas de las células (en los primeros días de cultivo) y el fluido.

	Densidad $\left(\frac{g}{cm^3}\right)$	Tamaño (μm)	Diámetro medio (μm)	Viscosidad dinámica $\left(\frac{Kg}{m*s}\right)$
RPMI 1640	1,0053	-----	-----	$1,37 \times 10^{-3}$
DMEM	1,0076	-----	-----	$1,38 \times 10^{-3}$
Cúmulos Celulares	1,0228	No determinado ¹⁶	No determinado	-----
Población de células grandes	1,006	17 a 25	22,71	-----
Población de células medianas	1,017	13 a 18	16,75	-----
Población de células pequeñas		9 a 14	11,63	-----

En el siguiente capítulo se usaran estos parámetros físicos, para encontrar teóricamente las trayectorias seguidas por las células dentro del canal, lo que permitirá determinar a priori qué flujos deberán ser usados para lograr una separación de las poblaciones celulares con la técnica SPLITT.

¹⁶ El tamaño de estos grupos celulares no puede ser determinado, puesto que varía dependiendo del número de células que tengan.

3. Modelo Físico de la Separación

El objetivo de este capítulo es mostrar los resultados teóricos obtenidos a través de un modelo físico simple, en el cual, se tiene en cuenta la interacción de las células con el campo gravitacional y el fluido que las transporta, lo que permitió, para un dispositivo experimental en particular, desarrollar una simulación que provee información a priori sobre los flujos que deben ser usados para lograr la separación. Por consiguiente, en la primera parte de este capítulo se presenta el análisis físico del movimiento de las células en el canal que dio como resultado la obtención de sus ecuaciones de movimiento, las cuales fueron solucionadas por el método de Runge-Kutta de cuarto orden; con lo que se determinó, para ciertas condiciones, las posibles trayectorias de las células al interior del canal. Luego se propone, con resultados teóricos y evidencia experimental, una alternativa para optimizar la separación de estas poblaciones celulares, por la técnica SPLITT, al acoplar un campo acústico al dispositivo experimental; lo que aumenta la resolución de la técnica, al explorar otro parámetro físico de las células.

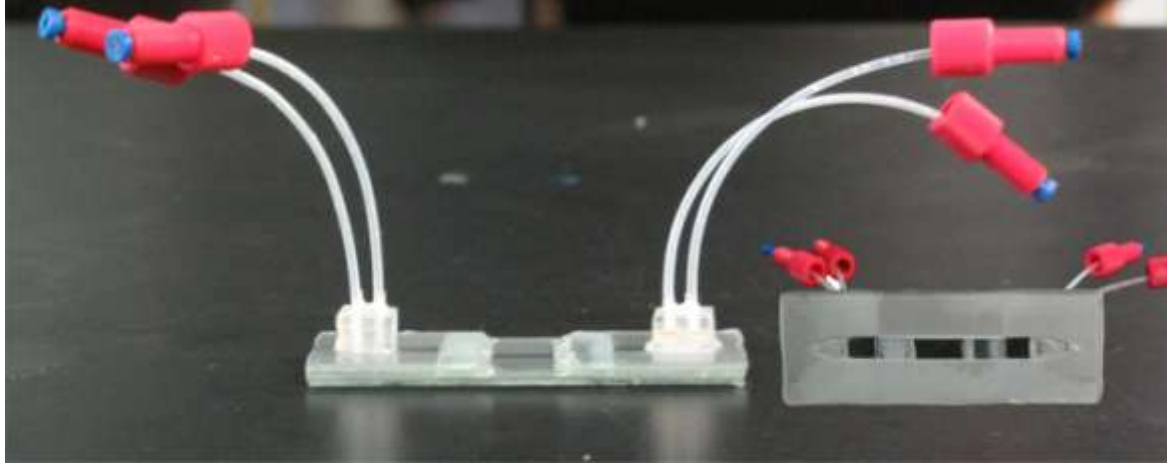
3.1 Simulación de la Separación

3.1.1 Dispositivo experimental

El dispositivo experimental usado en este trabajo fue un canal de separación Step-SPLITT (ver Figura 3-1) con un espesor w de $\sim 340\mu m$, un ancho b de $\sim 0.5cm$ y una longitud L de $\sim 3.074cm$, el cual, debido a sus dimensiones, tenía un volumen de $\sim 52.2\mu l$. Es importante resaltar que el volumen del canal debe ser pequeño puesto que en el caso de un cultivo primario, como el de células de Schwann, la cantidad de muestra inicial que se tiene es baja. Por otro lado los números adimensionales dados por las ecuaciones (1.1) y (1.2), para este canal, tienen un valor de $\sim 90,41$ y $\sim 14,70$ respectivamente, que según lo mencionado en el capítulo 1 permiten asumir: un flujo laminar al interior del

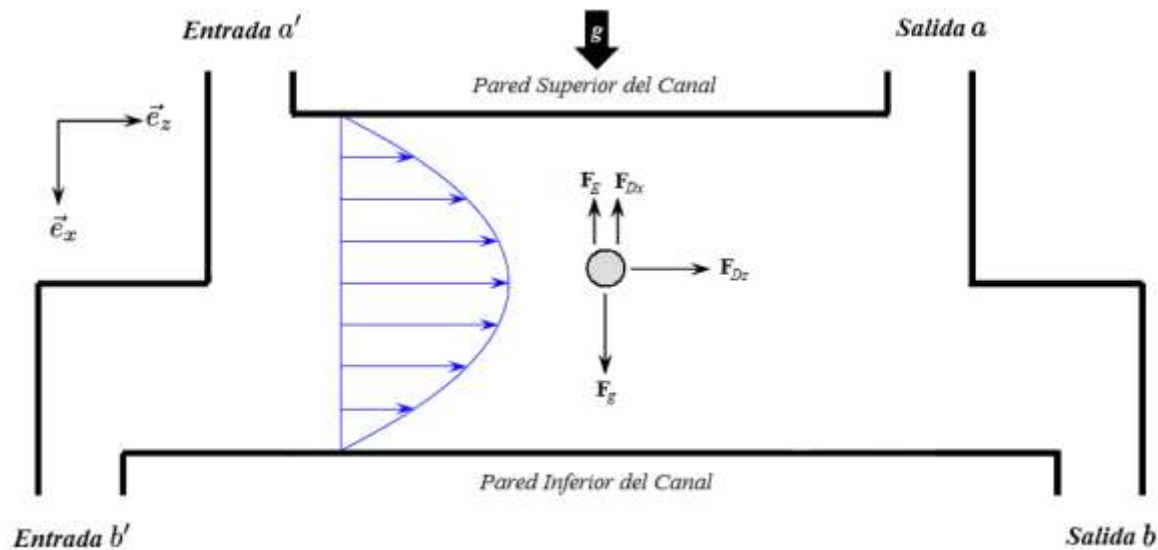
canal, flujo de tipo Poiseuille, y poca interacción entre las células y las paredes laterales del canal.

Figura 3-1: Dispositivo experimental.



3.1.2 Sistema físico a modelar

Figura 3-2: Fuerzas sobre una célula, al interior del canal. F_D representa la fuerza de arrastre o fricción, F_g la fuerza inducida por el campo gravitacional y F_E la fuerza de empuje.



Con los dos supuesto anteriores, hechos a partir de la geometría del canal, y, además, teniendo en cuenta, como se mostró en el capítulo 2, que las poblaciones celulares en un cultivo de células de Schwann toman una forma esférica en suspensión y suponiendo que la muestra está diluida de tal manera que se pueden ignorar las interacciones entre

las células. Se tiene entonces, que el sistema físico a modelar, en este caso, es una célula en suspensión de forma esférica, la cual es transportada, axialmente por un flujo de tipo Poiseuille y transversalmente por un campo de fuerza aplicado, al interior de un canal Hele-Shaw; cuyas interacciones con las otras células y las paredes laterales del canal pueden ser despreciadas, como se ilustra en el diagrama de fuerzas de la Figura 3-2.

3.1.3 Fuerzas que actúan sobre la célula

Una célula al entrar en el canal es sometida a varias fuerzas: la fuerza de arrastre generada por el transporte axial del fluido F_{Dz} , la fuerza inducida por el campo gravitacional F_g , la fuerza de fricción, entre la célula y el fluido, debida al movimiento transversal F_{Dx} y la fuerza de empuje F_E obtenida a partir del principio de Arquímedes (ver Figura 3-2). Otras interacciones como fuerzas entre partículas, fuerzas de sustentación hidrodinámica y fuerzas de van der Waals, en las regiones cercanas a las paredes del canal; son despreciadas al tener en cuenta, en el modelo, las condiciones mencionadas en la sub-sección anterior. A continuación se presentan la expresiones de las fuerzas que actúan sobre la célula, las cuales fueron tomadas de Ratier 2009 y Townsend *et al.* 2004.

Fuerza de Flotación \vec{F}_b

Es la fuerza resultante entre la fuerza gravitacional y el empuje, la cual está dada por:

$$\vec{F}_b = \vec{F}_g + \vec{F}_E \quad (3.1)$$

Si se tiene en cuenta el sistema de referencia elegido (ver Figura 3-2), se pueden escribir $\vec{F}_g = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho_{cel} g \vec{e}_x$ y $\vec{F}_E = -\frac{4}{3}\pi r^3 \rho_f g \vec{e}_x$, para el caso de una célula esférica; entonces, al sustituir \vec{F}_g y \vec{F}_E en la ecuación (3.1), esta toma la forma:

$$\vec{F}_b = \frac{4}{3}\pi r^3 (\rho_{cel} - \rho_f) g \vec{e}_x \quad (3.2)$$

Donde r y ρ_{cel} son el radio y densidad de la célula respectivamente, ρ_f la densidad del fluido y g la aceleración gravitacional.

Fuerza de arrastre o fricción \vec{F}_D

Es la fuerza generada al colocar un objeto dentro de un fluido en movimiento, (o cuando un objeto se mueve dentro de un fluido en reposo) cuya dirección es la misma que la del movimiento del fluido relativo al objeto (Hughes & Brighton 1970). Generalmente esta fuerza depende de: la densidad del fluido ρ_f , la velocidad relativa \vec{U}_o entre el fluido y el cuerpo (que se mueven a velocidades $\vec{v}(z, x)$ y $\vec{u}(z, x)$ respectivamente) y el tamaño, forma y orientación del cuerpo (Cengel & Cimbala 2006, Townsend *et al.* 2004); sin embargo, es común encontrar la fuerza de arrastre escrita en términos de una magnitud adimensional relacionada con las características del cuerpo, conocida como coeficiente de arrastre C_D , con la cual se tiene que:

$$\vec{F}_D = \frac{1}{2} C_D \rho_f U_o^2 A \quad (3.3)$$

Donde A es el área frontal (área proyectada en un plano normal a la dirección del flujo) del cuerpo. Estos coeficientes de arrastre C_D evidencian para flujos laminares (números de Reynolds pequeños $Re < 2300$), transicionales (números de Reynolds dentro del intervalo $2300 \leq Re \leq 4000$) y turbulentos (números de Reynolds grandes $Re > 4000$) distintos comportamientos (Cengel & Cimbala 2006). En nuestro caso, en el que la célula se puede considerar como un cuerpo esférico moviéndose en un flujo con número de Reynolds pequeño ($Re \leq 1$) este coeficiente estará dado por:

$$C_D = \frac{24}{Re} \quad (3.4)$$

En el cual Re es escrito usando el número de Reynolds de la partícula Re_p ¹⁷ (Townsend *et al.* 2004); entonces al sustituir el número de Reynolds en el coeficiente C_D y remplazando la relación obtenida en (3.3), la fuerza de arrastre puede ser escrita, en términos del radio r de la célula, como:

$$\vec{F}_D(z, x) = 6\pi\eta r(\vec{v}(z, x) - \vec{u}(z, x)) \quad (3.5)$$

¹⁷ Se relaciona con el número de Reynolds del fluido a través de la razón de escalas, entre el diámetro de la partícula y la longitud del canal, $Re_p = Re \left(\frac{d}{L_c}\right)^2$ (Bhagat *et al.* 2009).

La relación anterior es conocida como ley o fuerza de arrastre de Stokes. Para el modelo físico elegido, ilustrado en la Figura 3-2, esta fuerza de arrastre tiene dos componentes: una vertical (en la dirección del vector unitario \vec{e}_x) que corresponde a la fuerza de fricción que experimenta la célula por su caída a través del fluido en reposo:

$$\vec{F}_{Dx} = -6\pi\eta r u_x \vec{e}_x \quad (3.6)$$

y otra componente horizontal (en la dirección del vector unitario \vec{e}_z) donde la célula, que por su inercia opone resistencia al movimiento del fluido, es transportada por este con una velocidad $v_z(x)$ (ver Ecuación (1.3)):

$$\vec{F}_{Dz} = 6\pi\eta r (v_z(x) - u_z) \vec{e}_z \quad (3.7)$$

Velocidad de Sedimentación

Una célula al entrar en el canal es sometida transversalmente a la acción de la fuerza de flotación (ver Ecuación (3.2)) y la fuerza de arrastre (ver Ecuación (3.6)), las cuales, en un primer instante, generan sobre esta una aceleración que posteriormente se hace cero, cuando la célula alcanza su velocidad limite o velocidad de sedimentación U , dada por la expresión (ver Ecuación (1.25)):

$$U = \frac{d^2(\rho_{cel}-\rho_f)g}{18\eta} \quad (3.8)$$

Que es obtenida de la condición de equilibrio:

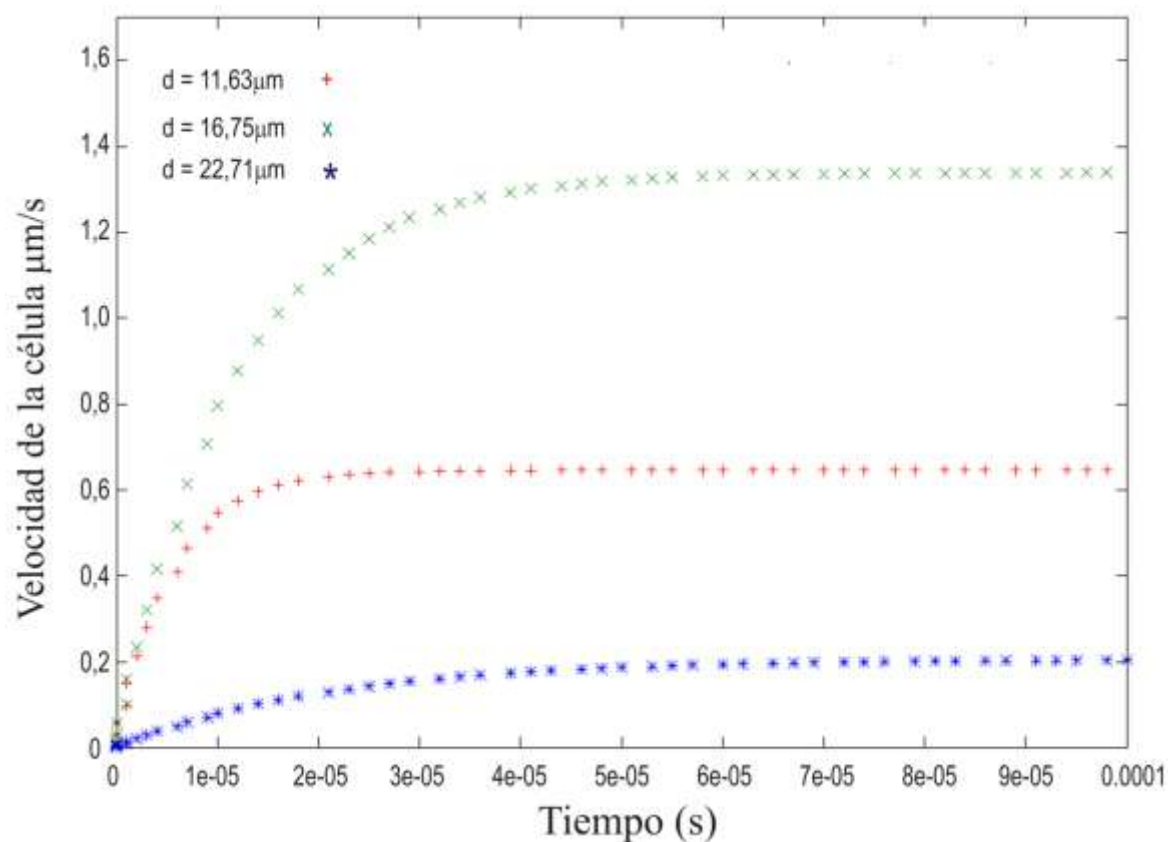
$$\vec{F}_b + \vec{F}_{Dx} = \mathbf{0} \quad (3.9)$$

Es importante notar que la velocidad de sedimentación es directamente proporcional al diámetro al cuadrado de las células, es decir, que esta disminuye cuando el diámetro d de las células es pequeño y aumenta si el diámetro es grande; por otro lado, la sedimentación de las células es cero cuando su densidad es igual a la densidad del medio. En la Figura 3-3¹⁸ se muestra para tres células en el canal (que representan las poblaciones celulares en un cultivo de células de Schwann según las mediciones hechas con el Coulter en el capítulo anterior), con diámetros: $11,63\mu m$, $16,75\mu m$ y $22,71\mu m$, que

¹⁸ Gráficas obtenidas al solucionar las ecuaciones de movimiento de las células en C++ por el método de Runge-Kutta de cuarto orden para un $dt = 1 \times 10^{-8}$.

debido a la acción del campo gravitacional, estas son aceleradas al comienzo, pero después de un tiempo alcanzan una velocidad constante que corresponde a su velocidad de sedimentación.

Figura 3-3: Velocidad u_x de las tres células, que representan los tamaños de las poblaciones celulares, en función del tiempo.



En la Tabla 3-1 se presentan las velocidades de sedimentación de cada una de las poblaciones celulares.

Tabla 3-1: Velocidades de sedimentación en RPMI.

Población celular	Diámetro medio (μm)	Densidad ($\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$)	Velocidad de sedimentación ($\mu\text{m/s}$)
Pequeñas ($9\mu\text{m} - 14\mu\text{m}$)	11,63	1,017	0,645676
Medianas ($13\mu\text{m} - 18\mu\text{m}$)	16,75	1,017	1,33933
Grandes ($17\mu\text{m} - 25\mu\text{m}$)	22,71	1,006	0,205168

Por último es importante resaltar que las velocidades U de las poblaciones celulares, mostradas en la Tabla 3-1, son pequeñas comparadas con las velocidades de sedimentación de partículas de Látex¹⁹, de $10\mu m$, $15\mu m$ y $20\mu m$, las cuales tienen valores de $1,79015\frac{\mu m}{s}$, $4,02783\frac{\mu m}{s}$ y $7,16058\frac{\mu m}{s}$, respectivamente.

Ecuaciones de movimiento

Para determinar las trayectorias de las células en el canal primero es necesario hallar sus ecuaciones de movimiento, que se obtienen al sumar las fuerzas que actúan sobre las células, descritas en los párrafos anteriores; por lo tanto, la sumatoria de fuerzas se puede escribir de forma vectorial como:

$$\Sigma \vec{F} = \vec{F}_b + \vec{F}_D \quad (3.10)$$

Donde, según lo mencionado, \vec{F}_b y \vec{F}_D representan las fuerzas de flotabilidad y arrastre. Ahora descomponiendo esta sumatoria en sus componentes z y x y aplicando la segunda ley de Newton (teniendo en cuenta las expresiones (3.2), (3.6) y (3.7)) se encuentra que las ecuaciones que gobiernan el movimiento de las células al interior del canal son:

$$\dot{z} = u_z \quad (3.11)$$

$$\ddot{z} = \frac{9\eta}{2r^2\rho_{cel}}(v_z(x) - u_z) \quad (3.12)$$

$$\dot{x} = u_x \quad (3.13)$$

$$\ddot{x} = \frac{1}{\rho_{cel}}(\rho_{cel} - \rho_f)g - \frac{9\eta u_x}{2r^2} \quad (3.14)$$

Estas ecuaciones deben ser resueltas para modelar las trayectorias de las células dentro del canal. En las siguientes sub-secciones se explica cual fue el método numérico usado para integrar estas ecuaciones y se muestran los resultados obtenidos al simular las trayectorias para diferentes valores del flujo total Q al interior del canal.

¹⁹ La densidad reportada para estas partículas es $\sim 1.050\frac{g}{cm^3}$.

3.1.4 Solución de las ecuaciones de movimiento

El programa, que permitió solucionar las ecuaciones de movimiento de las células y modelar sus trayectorias, se hizo utilizando el lenguaje de programación C++; este se inspiró en dos programas predecesores: uno escrito en lenguaje Fortran90, en el que se simuló la separación de partículas en el canal, bajo la acción de un campo acústico (Ratier 2009, Ratier & Hoyos 2010) y el otro escrito en Matlab, en el que se buscaba simular la separación de partículas magnéticamente susceptibles sometidas a la acción de un campo magnético (Liard 2010). En el programa, hecho para este trabajo, se escribió un algoritmo, que a partir de ciertas condiciones iniciales para el sistema, permitió, por el método de Runge-Kutta de cuarto orden, integrar las ecuaciones (3.11), (3.12), (3.13) y (3.14); determinando, así, las trayectorias tomadas por tres células²⁰ al interior del canal.

El método de Runge-Kutta

Es un método de integración que permite resolver numéricamente ecuaciones diferenciales ordinarias de primer orden, de la forma:

$$\frac{dy}{dx} = f(x, y) \quad (3.15)$$

Cuyas soluciones, pueden ser expresadas, al integrar la ecuación (3.15) y usar una expansión de Taylor para la función $f(x, y)$, como (Press *et al.* 1992):

$$y_{n+1} = y_n + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) + O(h^5) \quad (3.16)$$

Donde $O(h^5)$ es el error por paso o error de truncamiento local (Rogan & Muñoz 2002) y los coeficientes k_i (con $i = 1, \dots, 4$) son:

$$k_1 = hf(x_n, y_n) \quad (3.17)$$

$$k_2 = hf\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{k_1}{2}\right) \quad (3.18)$$

$$k_3 = hf\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{k_2}{2}\right) \quad (3.19)$$

$$k_4 = hf(x_n + h, y_n + k_3) \quad (3.20)$$

²⁰ Con diámetros iguales a los diámetros medios, de las poblaciones celulares, medidos por el Coulter.

En los que h representa el paso de tiempo dt , usado para hacer la integración. Entonces, el algoritmo anterior consiste en calcular el coeficiente k_1 , a partir de las condiciones iniciales x_o, y_o y de la función $f(x_n, y_n)$, que es conocida. Después de eso, se incrementa el tamaño del paso en $\frac{h}{2}$ y, con el valor de k_1 , se calcula el coeficiente k_2 , luego k_3 y finalmente k_4 (Hjorth 2011); que al ser sumados con la condiciones iniciales dadas (ver Ecuación (3.16)) permiten encontrar el nuevo valor de la variable y_{n+1} .

En nuestro caso las variables y 's (ver Ecuación (3.16)) y las funciones $f(x_n, y_n)$ (ver Ecuación (3.17)) son:

$$y = (z \quad x \quad v_z \quad v_x) \quad (3.21)$$

$$f(x_n, y_n) = (v_z \quad v_x \quad \ddot{z} \quad \ddot{x}) \quad (3.22)$$

Donde la forma concreta de las funciones $f(x_n, y_n)$ se muestra en las ecuaciones (3.11), (3.12), (3.13) y (3.14).

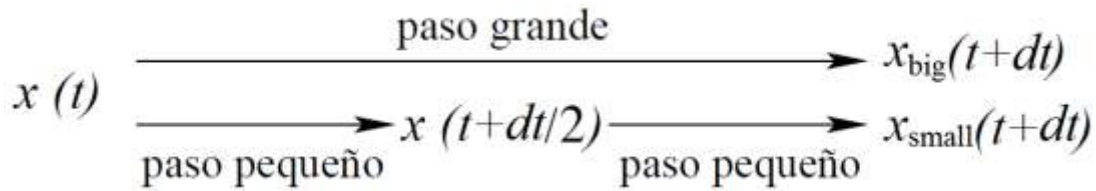
Paso de tiempo

Para lograr una solución correcta, con una buena precisión, de las ecuaciones de movimiento (3.11), (3.12), (3.13) y (3.14), en la simulación se usó un paso inicial $dt = 1 \times 10^{-6}$; la necesidad de usar este paso de tiempo tan pequeño, se evidencia en la Figura 3-3, en la cual se muestra que las células en el canal, en un primer instante, experimentan una gran variación de su velocidad u_x en un tiempo muy corto, que solo puede ser registrada si se usan pasos de tiempo del orden de 10^{-6} o menores. Sin embargo una vez que las células han alcanzado su velocidad de sedimentación U (velocidad límite) la aceleración que ellas experimentan tiende a cero (ver Figura 3-3), por lo tanto, el paso inicial puede cambiarse, en esta parte de la trayectoria, por un paso de tiempo más grande; disminuyendo, así, el tiempo de cálculo del programa.

Teniendo en cuenta estas características del movimiento de las células, se diseñó para el programa una rutina que permitió usar pasos de tiempo pequeños cuando las células eran aceleradas y pasos de tiempo grandes cuando alcanzaban su velocidad de sedimentación; esta rutina se construyó con un método conocido como: paso de tiempo adaptativo (Press *et al.* 1992, Rogan & Muñoz 2002), que consiste en calcular en cada

paso de tiempo el error de truncamiento²¹ Δ_1 , el cual es obtenido al hacer la diferencia entre $x_{big}(t + dt)$ que es la solución en la dirección \vec{e}_x de la ecuación de movimiento, para el paso de tiempo dt y $x_{small}(t + dt)$ que es la misma solución, calculada en dos pasos, cada uno con paso de tiempo $\frac{dt}{2}$, como se ilustra en la Figura 3-4 (Rogan & Muñoz 2002).

Figura 3-4: Error de truncamiento (Rogan & Muñoz 2002).



$$\Delta_1 = |x_{big} - x_{small}| \quad (3.23)$$

Luego, este error de truncamiento, Δ_1 , es comparado con un error ideal o precisión deseada Δ_o , obtenida a partir de un nivel de tolerancia, ϵ , especificado. Si Δ_1 es demasiado grande, la respuesta es rebotada, el paso de tiempo dt se disminuye y el procedimiento se repite hasta que el error calculado sea aceptable. En el caso contrario, si el error es tolerable, el valor calculado es aceptado y un valor mayor de dt es usado en la próxima iteración (Press *et al.* 1992, Rogan & Muñoz 2002).

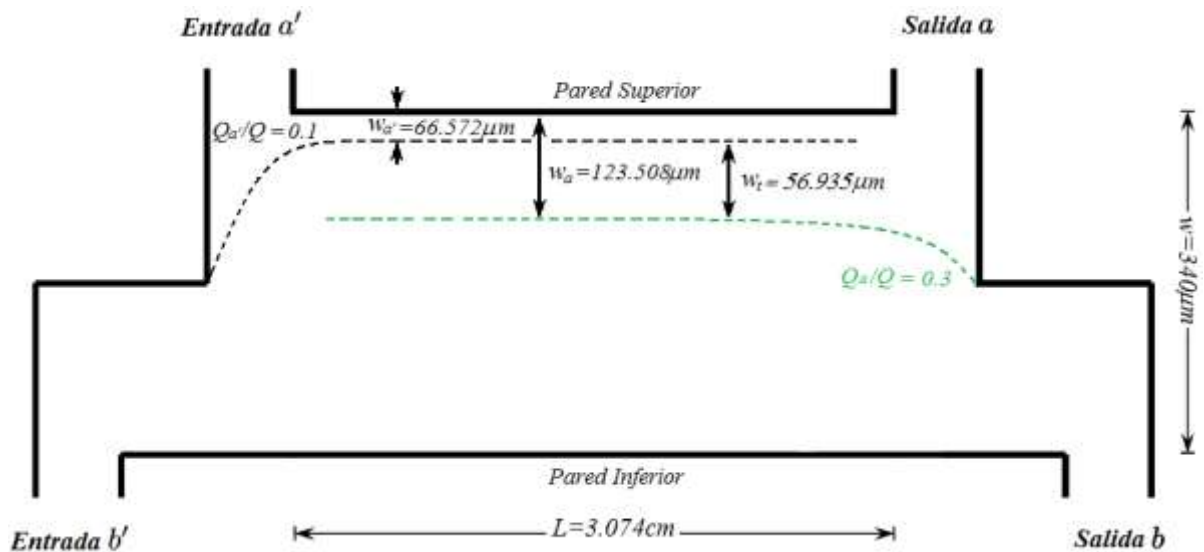
A continuación se presentan los resultados obtenidos al solucionar las ecuaciones de movimiento (3.11), (3.12), (3.13) y (3.14) para tres células con diámetro $11,63\mu m$, $16,75\mu m$ y $22,71\mu m$, iguales a los diámetros medios de las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann. Las trayectorias simuladas, que se muestran en la siguiente sub-sección, se encontraron para un tiempo de cálculo aceptable.

²¹ Error cometido al determinar las posiciones $z(t)$ y $x(t)$ de las células en el canal.

3.1.5 Resultados

Antes de mostrar los resultados es importante poner el contexto de la situación a simular. Lo primero es recordar, según lo mencionado en capítulo 1, que para obtener una resolución aceptable de la separación con la técnica SPLITT gravitacional, la posición del ISP debe estar lo más cerca posible a la pared superior del canal, lo que ayuda a focalizar las células en esta región; por otra parte, debido a que la velocidad de sedimentación de las poblaciones celulares es baja (ver Tabla(3.1)), es necesario elegir una región de transporte con espesor w_t pequeño, para permitir que alguna de las poblaciones celulares sea capaz de atravesar esta región y salir por b . Entonces, para conseguir estas condiciones en la separación, se eligieron las razones $Q_{a'}/Q = 0.1$ y $Q_a/Q = 0.3$, con las que se logró tener, al interior del canal, una región de transporte de espesor $w_t = 56.935\mu m$, con la posición que se ilustra en la Figura 3-5.

Figura 3-5: Posición de la zona de transporte.



Después de establecer las posiciones de los planos ISP y OSP en el canal, lo siguiente fue determinar qué flujos totales Q , se deberían usar para separar las poblaciones

celulares²² suspendidas en RPMI. Por lo tanto, teniendo en cuenta que su velocidad de sedimentación era pequeña, se simularon sus trayectorias comenzando por un flujo total $Q = 10 \text{ ml/h}$ que se fue reduciendo paulatinamente hasta encontrar los flujos óptimos que permitían la separación de estas poblaciones celulares. En la Tabla 3-2 se muestran tres flujos totales Q que resumen el procedimiento descrito en este párrafo.

Tabla 3-2: Flujos usados en la simulación.

Flujo total Q (ml/h)	Velocidad media \bar{v} (mm/s)	Flujos a las entradas y salidas (ml/h)	
10	1,633	$Q_{a'} = 1$	$Q_a = 3$
		$Q_{b'} = 9$	$Q_b = 7$
2	0,326	$Q_{a'} = 0,2$	$Q_a = 0,6$
		$Q_{b'} = 1,8$	$Q_b = 1,4$
1	0,1633	$Q_{a'} = 0,1$	$Q_a = 0,3$
		$Q_{b'} = 0,9$	$Q_b = 0,7$

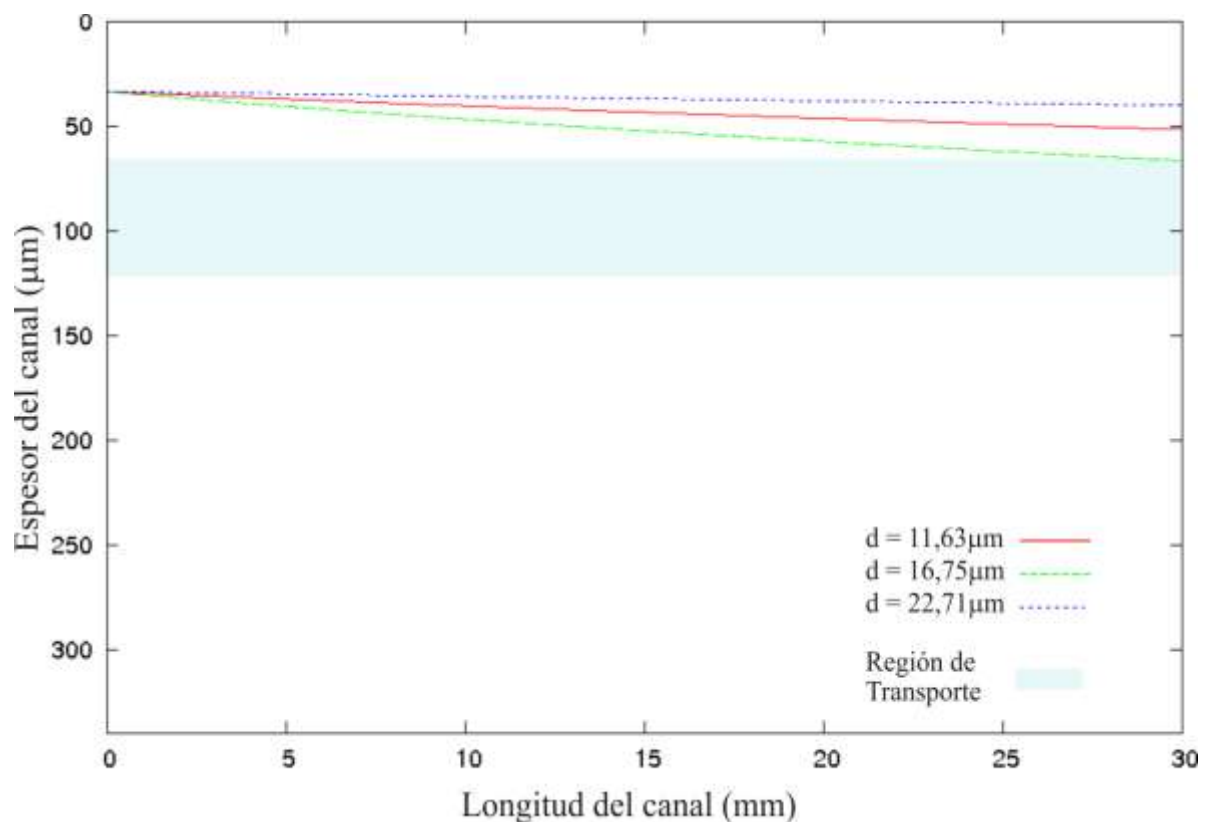
A continuación se presentan en las Figuras 3-6, 3-7 y 3-8, las trayectorias simuladas, para los flujos mostrados en la Tabla 3-2, que se calcularon al insertar en el programa los valores de los parámetros físicos de las células y el fluido, obtenidos experimentalmente en el capítulo 2, y las dimensiones del canal Step-SPLITT, ilustrado en la Figura 3-1.

En la Figura 3-6 se muestran las trayectorias de las tres poblaciones celulares, para una posición inicial $x = ISP/2$, encontradas al usar un flujo total $Q = 10 \text{ ml/h}$ en el canal; como se observa, en este caso, el flujo axial Q es mayor que el flujo transversal ΔQ de las células, por lo tanto, ninguna de las poblaciones celulares se sedimenta lo suficiente, para alcanzar a travesar la región de transporte y salir por b , entonces todas las células son recolectadas por la salida a . Es importante notar en esta figura, que la célula con

²² Representadas por tres células con diámetros $11,63\mu\text{m}$, $16,75\mu\text{m}$ y $22,71\mu\text{m}$.

diámetro $d = 22.71\mu\text{m}$, la cual representa la población de células grandes, tiene como trayectoria una línea casi paralela al eje de las abscisas, lo que implica que su velocidad de sedimentación es aproximadamente cero en el RPMI; conclusión que es fácil de obtener si se compara la densidad de esta población celular (ver Tabla 3-1) con la densidad encontrada para el RPMI (ver Ecuación (2.9)). Por tal razón en las Figuras 3-7 y 3-8, donde se muestran las trayectorias para los flujos totales $Q = 2\text{ ml/h}$ y $Q = 1\text{ ml/h}$, no se coloca la trayectoria de esta población celular, puesto que, debido a su baja densidad, siempre será recolectada por la salida a .

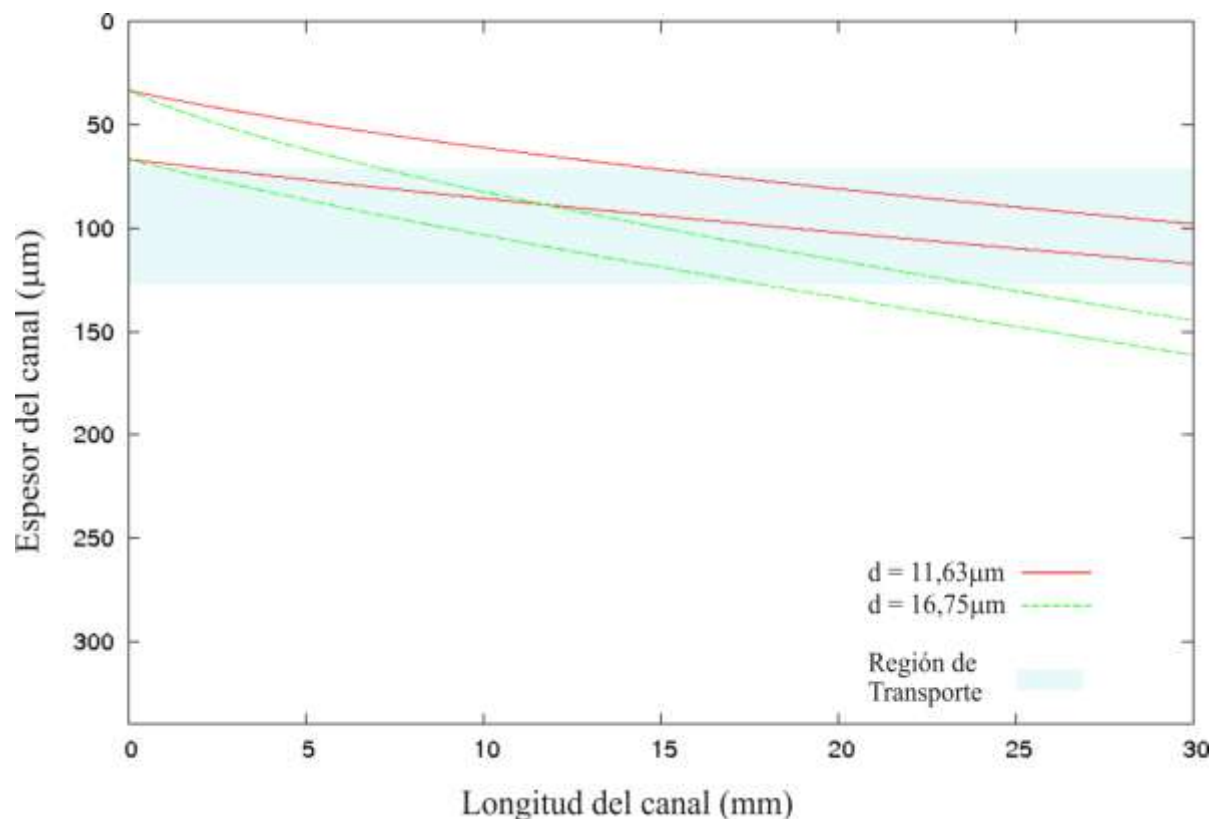
Figura 3-6: Trayectorias de las poblaciones celulares para un flujo de 10 ml/h .



En la Figura 3-7 se ilustran las trayectorias de las poblaciones de células pequeñas y medianas, representadas por dos células con diámetros $d = 11,63\mu\text{m}$ y $d = 16,75\mu\text{m}$ respectivamente, para un flujo total $Q = 2\text{ ml/h}$. Como se observa, en este caso, a diferencia del anterior, el flujo total Q no es tan grande comparado con el flujo transversal de las partículas ΔQ , por lo tanto la célula con diámetro $d = 16,75\mu\text{m}$, que representa la población de células medianas, tiene el tiempo suficiente para atravesar la región de transporte y salir por b ; por otro lado, aunque la célula con diámetro $d = 11,63\mu\text{m}$ entra

en la región de transporte, esta no alcanza a cruzar esta región completamente, entonces, la población de células pequeñas, representada por esta célula, es recuperada en la salida *a*, es decir, que es posible separar las poblaciones celulares de tamaño mediano ($d = 16,75\mu m$) de las poblaciones celulares de tamaño grande ($d = 22,71\mu m$) y pequeño ($d = 11,63\mu m$). Se debe resaltar, como se muestra en la figura 3-7, que las células son inyectadas en dos capas²³ de espesor $\sim 33,286\mu m$, con el objetivo de simular una nube de células desplazándose en el canal y no una sola célula, lo que permite tener una mejor aproximación al simular la separación de las poblaciones celulares.

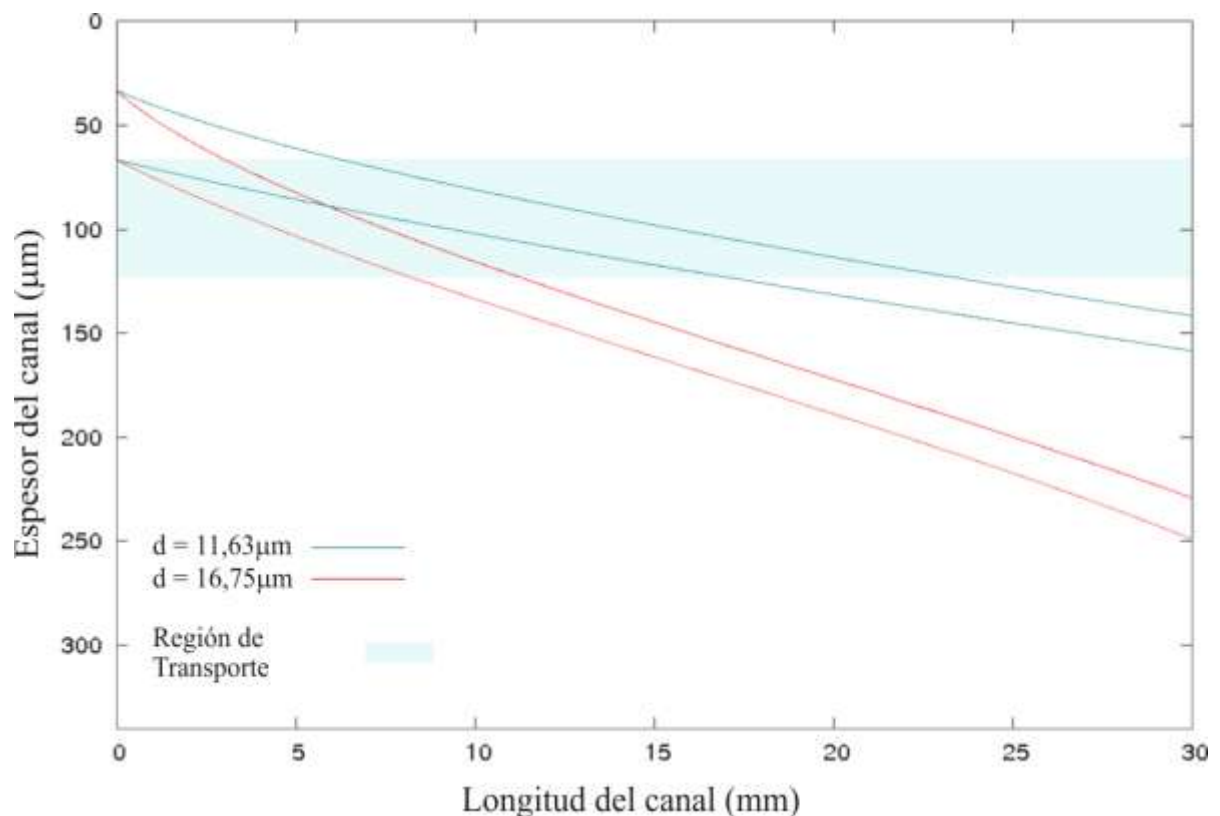
Figura 3-7: Trayectorias de las poblaciones celulares para un flujo de 2 ml/h .



²³ Que se obtienen al graficar las trayectorias de las células con diámetros $d = 11,63\mu m$ y $d = 16,75\mu m$, para dos posiciones iniciales $x = ISP/2$ y $x = ISP$.

Por último en la Figura 3-8 se grafican las trayectorias de las células con diámetros $d = 11,63\mu m$ y $d = 16,75\mu m$, inyectadas, al igual que en la Figura 3-7, en dos capas con espesor $\sim 33.286\mu m$, para un flujo total $Q = 1 ml/h$. Para este flujo Q , las células, que representan las poblaciones celulares pequeñas y medianas, tiene el tiempo suficiente para sedimentarse y a travesar totalmente la región de transporte, es decir, que en este caso el flujo transversal de las partículas ΔQ es mayor que el flujo total Q , por lo que ambas poblaciones serán recuperadas por la salida b .

Figura 3-8: Trayectorias de las poblaciones celulares para un flujo de $1 ml/h$.

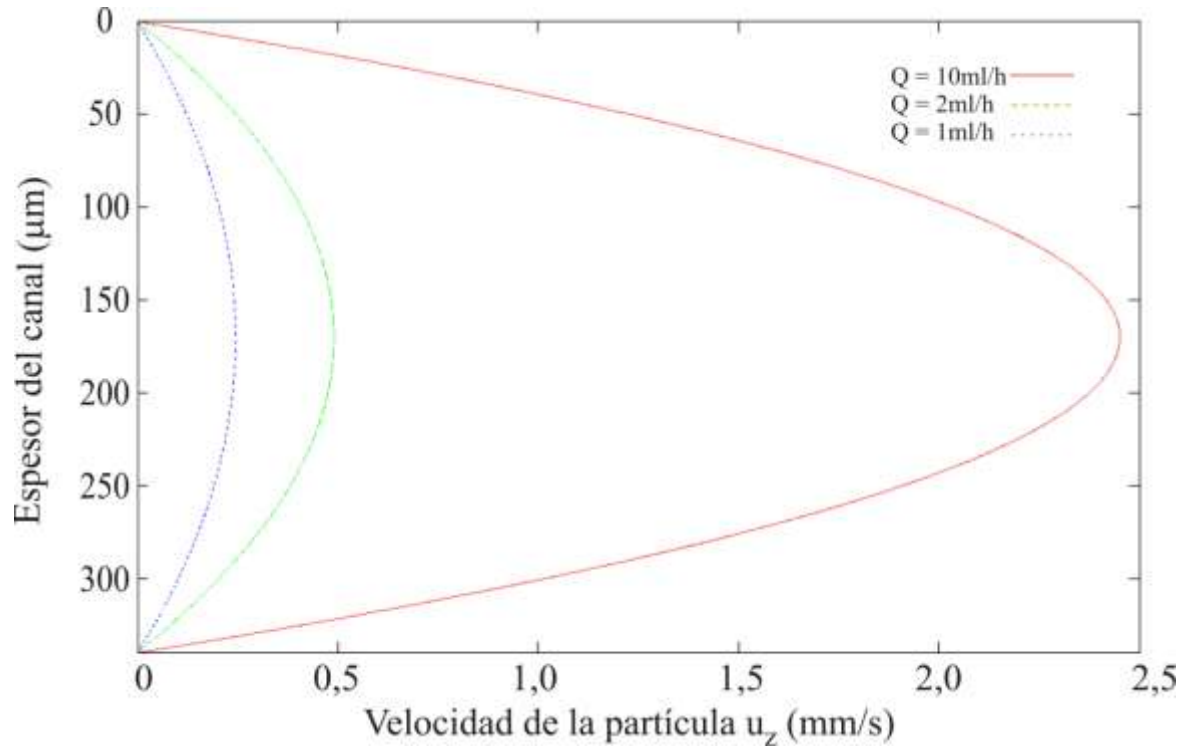


Flujo en el Canal

Como se mencionó en el capítulo 1, se espera que los flujos totales de $10 ml/h$, $2 ml/h$ y $1 ml/h$ usados en la simulación, se comporten como flujos de tipo Poiseuille. Entonces, para corroborar este supuesto teórico se modeló, al interior del canal, una partícula con densidad $\rho_p = 2.42 g/cm^3$ (que corresponde a la densidad de una partícula de sílice) y

diámetro igual a $10\mu m$, a la cual se le solucionaron sus ecuaciones de movimiento con las mismas condiciones²⁴ usadas en las poblaciones celulares; de lo que se obtuvo al graficar el espesor del canal w en función de la velocidad u_z de la partícula, las gráficas ilustradas en la Figura 3-9.

Figura 3-9: Perfiles de velocidad en el canal, encontrados para los flujos totales $Q = 10\text{ ml/h}$, $Q = 2\text{ ml/h}$ y $Q = 1\text{ ml/h}$.



Por lo tanto, al observar las parábolas en la Figura 3-9, se puede concluir que la distribución de velocidades al interior del canal, para los flujos totales Q usados en la simulación, es de tipo Poiseuille. Además si se calcula para las velocidades medias de estos flujos, mostradas en la Tabla 3-2, los números de Reynolds, que en este caso están definidos por (Ratier 2009):

$$Re = \frac{\rho_f \bar{v} w}{\eta} \quad (3.24)$$

²⁴A excepción de su posición inicial x que, en este caso, se hizo igual a cero.

Se evidencia que estos flujos tienen un comportamiento laminar al interior del canal (ver Tabla 3-3).

Tabla 3-3: Números de Reynolds de los flujos totales $Q = 10 \text{ ml/h}$, $Q = 2 \text{ ml/h}$ y $Q = 1 \text{ ml/h}$.

Velocidad media \bar{v} (mm/s)	Números de Reynolds (Re)
1,633	0,407
0,326	0,081
0,1633	0,040

3.2 Otra alternativa el HACS

Para terminar, en esta sección se presenta una alternativa que permite optimizar la separación de las poblaciones celulares, mostrada en la Figura 3-6, al acoplar al canal Step-SPLITT un campo acústico. Esta técnica conocida como Hydrodynamic Acoustic Cell Sorter (HACS) ha sido usada recientemente en la separación binaria de partículas de Látex 5 y $10\mu\text{m}$ de diámetro con excelentes resultados (Ratier 2009, Ratier & Hoyos 2010). A continuación se presenta el principio teórico de esta nueva técnica de separación (que ha sido tomado de las referencias Ratier 2009, Ratier & Hoyos 2010 y Townsend *et al.* 2004), se evidencia experimentalmente que las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células reaccionan en presencia de un campo acústico y, por último, se muestran los resultados encontrados numéricamente al determinar las trayectorias de las poblaciones celulares, sometidas a la acción de un campo acústico; lo que permite sugerir, al final de esta sección, el uso de un canal Step-SPLITT, que combina fuerzas acústicas y gravitacionales, para la purificación de las poblaciones celulares que conforman un cultivo de células de Schwann.

Principio Teórico

Al acoplar a un canal Step-SPLITT, como el ilustrado en la Figura 3-1, un campo acústico, este se convierte en un resonador acústico flúidico, en el que se forman ondas estacionarias en su interior. Por consiguiente, una célula al entrar en este canal, además de experimentar la acción de las fuerzas mostradas en la Figura 3-2, también es sometida a la acción de una fuerza acústica, que es generada por las ondas estacionaria, a lo largo del espesor w del canal. La expresión de esta fuerza acústica en el caso de una onda estacionaria está dada por:

$$\vec{F}_{ac} = \frac{4}{3} \tilde{A} \pi \bar{e} r^3 k \sin(2kx) \vec{e}_x \quad (3.25)$$

Donde k es el número de onda²⁵, \bar{e} es la energía acústica media por unidad de volumen, r es el radio de la célula y \tilde{A} es un parámetro adimensional conocido como factor de contraste acústico, el cual tiene la forma:

$$\tilde{A} = \frac{3\rho_{cel} + 2(\rho_{cel} - \rho_f)}{2\rho_{cel} - \rho_f} - \frac{c_f^2 \rho_f}{c_{cel}^2 \rho_{cel}} \quad (3.26)$$

Donde c_{cel} y c_f son la velocidad del sonido en la célula y en el fluido respectivamente.

La fuerza acústica dada por la ecuación (3.25) es obtenida de un potencial escalar ϕ , según la definición:

$$\vec{F}_{ac} = \vec{\nabla} \phi \quad (3.27)$$

En la que ϕ se escribe como:

$$\phi = \frac{2}{3} \tilde{A} \pi r^3 \bar{e} \cos(2kx) \quad (3.28)$$

El principal efecto de esta fuerza acústica sobre las células inyectadas en el canal, es la atracción de estas a los nodos del campo de presión como se ilustra en la Figura 3-10. Estos nodos se mueven en el caso de una onda viajera y son fijos en una onda estacionaria.

Figura 3-10: Efecto de la fuerza acústica sobre las células (Gossett et al. 2010).



²⁵ Que en este caso está dado por $k = n\pi/w$, donde n es un número entero y w es el espesor del canal. La definición anterior es equivalente a decir que el espesor del canal debe ser un múltiplo entero de la mitad de la longitud de onda: $w = n(\lambda/2)$.

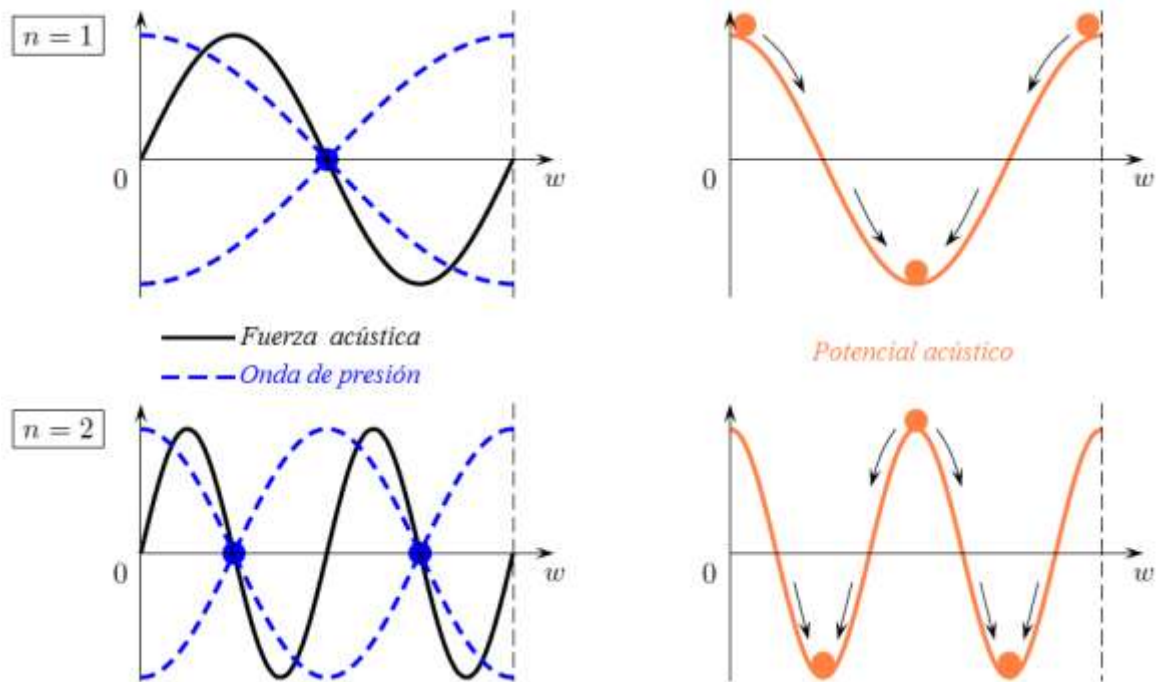
Para el caso de una onda estacionaria el campo de presión puede ser escrito en la forma:

$$p(x, t) = p_o \cos(kx) \cos(\omega t) \quad (3.29)$$

Donde p_o es la amplitud de la onda de presión y $\omega = 2\pi f$ es la pulsación o frecuencia angular, con f como la frecuencia.

En la figura 3-11 a la izquierda se presentan las gráficas de la fuerza acústica y el campo de presión correspondientes a $n = 1$ y $n = 2$. En el diagrama de la derecha se representa el potencial ϕ , del cual es obtenida la fuerza acústica, para los mismos valores de n . Los pozos de potencial en la imagen de la derecha son las posiciones de equilibrio estable que corresponde a las posiciones de los nodos de presión en la imagen izquierda. Se debe resaltar, como se menciono anteriormente, que las células en el canal son atraídas a estos nodos de presión.

Figura 3-11: fuerza acústica y su correspondiente campo de presión y potencial para $n = 1$ y $n = 2$ (Ratier & Hoyos 2010).

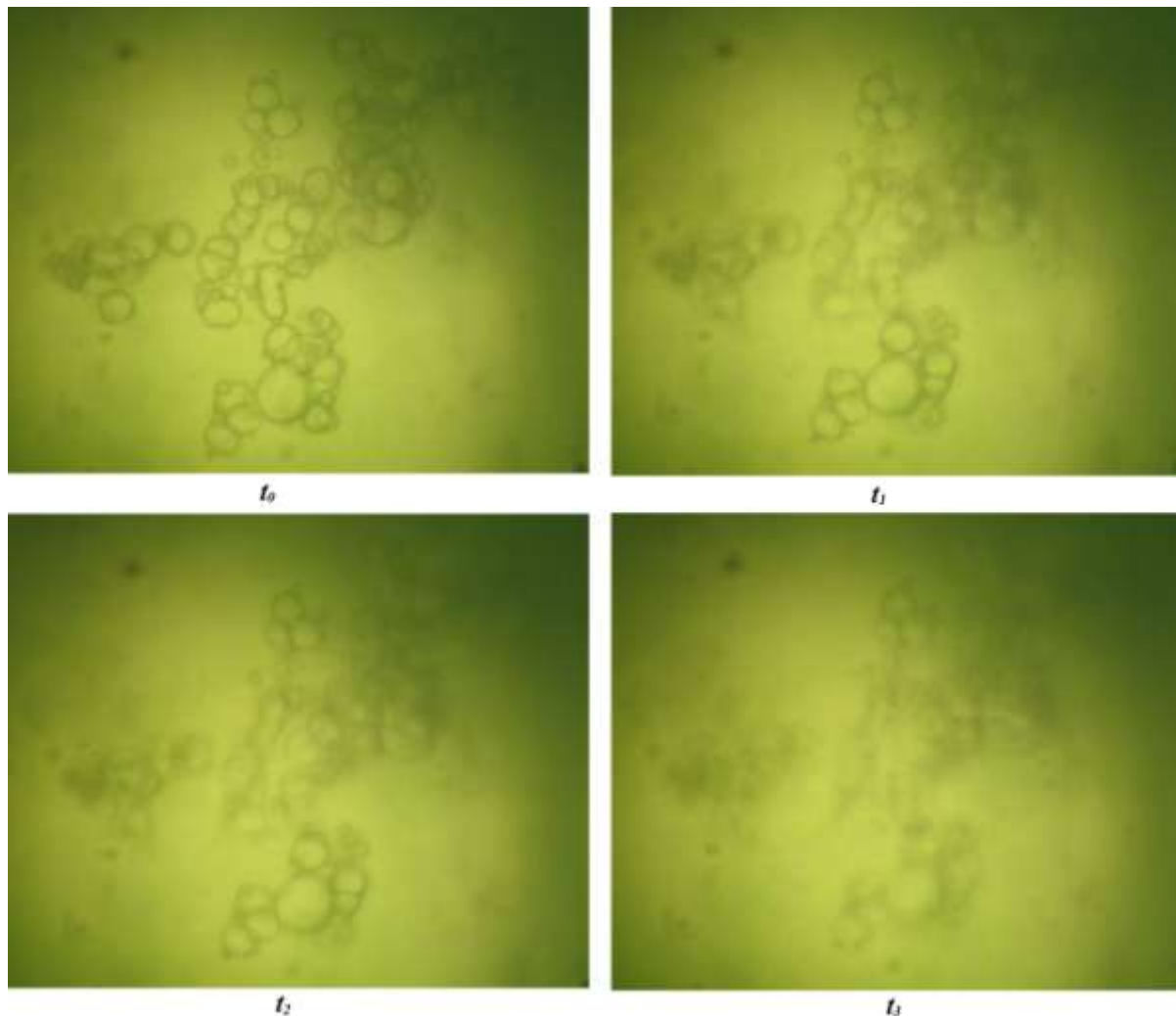


Por último es importante notar que la fuerza acústica aunque depende de la densidad de la célula ρ_{cel} , la velocidad del sonido en ella c_{cel} y su radio r (ver Ecuación (3.25)), esta fuerza aumenta considerablemente cuando el radio de la célula es grande.

Evidencia Experimental

Pruebas piloto, permitieron establecer experimentalmente que las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann reaccionan ante la presencia de un campo acústico como se ilustra en la Figura 3-12. En ella se observa que las células sometidas a fuerzas acústicas, tienden primero a agruparse (imagen t_0), para luego levitar, dirigiéndose, así, al nodo formado por el campo de presión (imágenes t_1 , t_2 y t_3). Estos resultados fueron obtenidos con canales diseñados exclusivamente para observar el efecto de la fuerza acústica sobre las células, en los cuales se logró determinar in situ que para obtener una onda estacionaria optima al interior del canal, que hiciera levitar las células, era necesario usar frecuencias entre 3,5 y 4,5MHz.

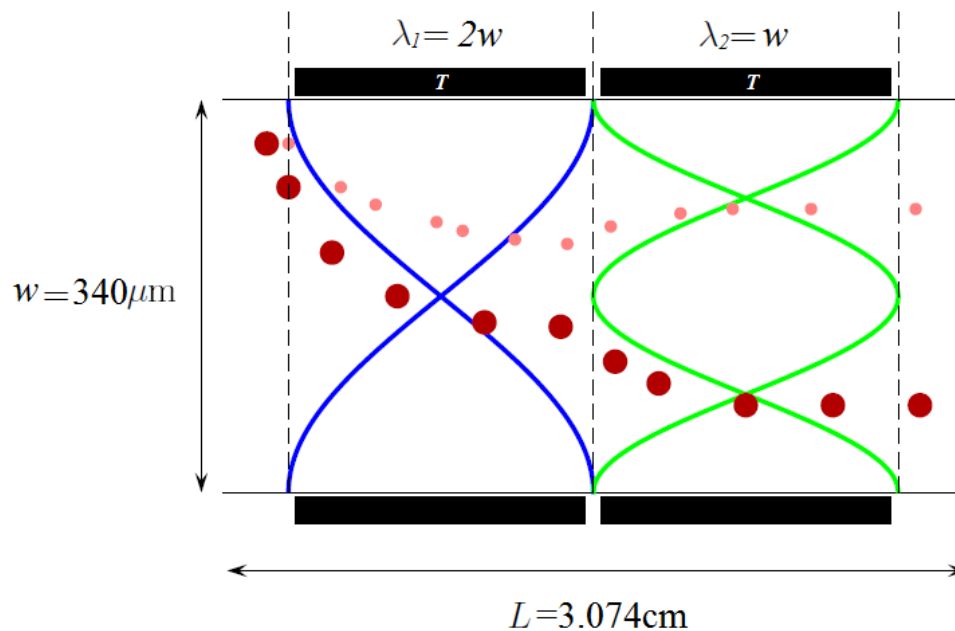
Figura 3-12: Levitación acústica de las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann.



Resultados de la Simulación

Para simular las trayectorias tomadas por las poblaciones celulares bajo la acción de una fuerza acústica en el interior del canal, primero se definió, al igual que en el caso gravitacional, las razones entre los flujos $Q_{a'}/Q = 0.1$ y $Q_a/Q = 0.3$, con lo que se obtuvo las mismas posiciones para los planos ISP y OSP mostradas en la Figura 3-5; luego de esto se estableció al interior del canal una configuración experimental como la ilustrada en la Figura 3-13, en la que se colocan dos transductores, T , con el objetivo de someter a las células, en la primera mitad del canal, a un campo acústico, que genere un solo nodo en esta región del canal y en la segunda mitad, a un campo acústico que forme un campo de presión con dos nodos.

Figura 3-13: Principio de la separación Splitt acústica (Ratier & Hoyos 2010).



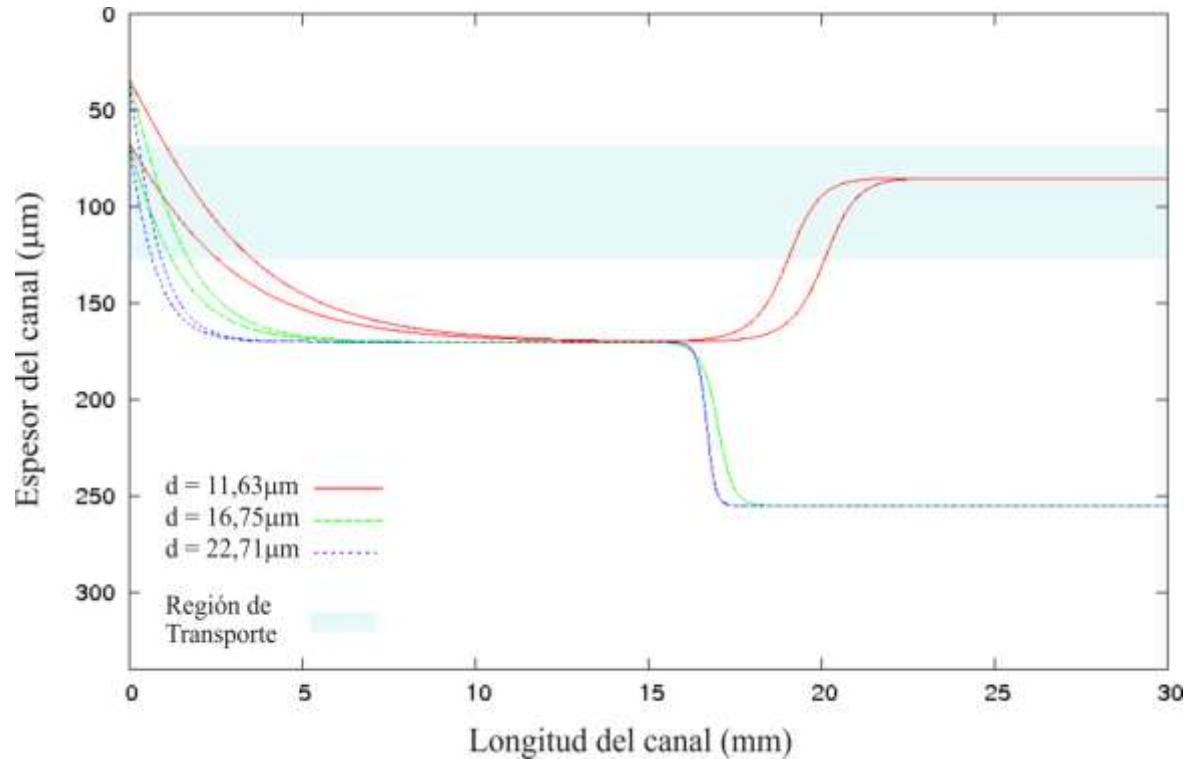
Teniendo en cuenta en la simulación la configuración anterior y usando los mismos parámetros del caso gravitacional, para un flujo total de $Q = 30 \text{ ml/h}$, ver Tabla 3-4.

Tabla 3-4: Flujo usado para separar las poblaciones celulares en el caso acústico.

Flujo total Q (ml/h)	Velocidad media \bar{v} (mm/s)	Números de Reynolds (Re)	Flujos a las entradas y salidas (ml/h)	
30	4,901	1,222	$Q_{a'} = 3$	$Q_a = 9$
			$Q_{b'} = 27$	$Q_b = 21$

Se obtiene al introducir la expresión de la fuerza acústica²⁶ (Ecuación (3.25)) en la ecuación de movimiento (3.14), las trayectorias de las tres células²⁷, con diámetros $11,63\mu m$, $16,75\mu m$ y $22,71\mu m$, ilustradas en la Figura 3-14.

Figura 3-14: Separación acústica de las tres poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann.



Para terminar se debe notar como se observa en la Figura 3-14, que en este caso, a diferencia de la separación gravitacional mostrada en la Figura 3-6, es posible separar las poblaciones celulares de mayor diámetro (células con diámetros medios $d = 16,75\mu m$ y $d = 22,71\mu m$) de las poblaciones de menor diámetro (células con diámetro medio $d = 11,63\mu m$), esto se debe a que la fuerza acústica, depende directamente del radio de la célula al cubo, según se mencionó anteriormente. Además, es necesario resaltar que la separación, se hace en un tiempo más corto, puesto que la velocidad media \bar{v} del flujo

²⁶ En la cual la velocidad de sonido en la célula se toma como $c_p = 2,407 \times 10^3 \text{ m/s}$, que corresponde a la velocidad del sonido para una partícula de Látex con densidad $\rho_p = 1.05 \text{ g/cm}^3$.

²⁷ Que representan las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann.

total en el canal (ver Tabla 3-4) es mayor que las velocidades medias usadas en el caso gravitacional (ver Tabla 3-2).

Con esto se concluye el estudio teórico de la separación de las poblaciones celulares, que conforman un cultivo de células de Schwann, por la técnica SPLITT. En el siguiente capítulo se recogerán y organizarán las conclusiones obtenidas durante el desarrollo del trabajo.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- En el capítulo 1 se evidencio al exponer los fundamentos teóricos de la técnica SPLITT en modo de sedimentación gravitacional que es necesario, antes de separar poblaciones celulares por este método, conocer algunas propiedades físicas de las células como su densidad, forma y tamaño, además de las propiedades físicas del fluido que las transporta. Por tal motivo, en este trabajo se realizaron las mediciones de estas propiedades (ver capítulo 2) para cultivos de células de Schwann (provenientes de nervio ciático y ganglio de la raíz dorsal de ratones adultos) y para los medios de cultivo celular RPMI 1640 y DMEM, lo que permitió obtener la información que se resume en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Propiedades físicas de las células (en los primeros días de cultivo) y el fluido.

	Densidad (g/cm^3)	Forma	Tamaño (μm)	Diámetro medio (μm)	Viscosidad dinámica ($Kg/m * s$)
RPMI 1640	1,0053	-----	-----	-----	$1,37 \times 10^{-3}$
DMEM	1,0076	-----	-----	-----	$1,38 \times 10^{-3}$
Cúmulos Celulares	1,0228	No definida	No determinado	No determinado	-----
Células pequeñas	1,017	Esférica en suspensión	9 a 14	11,63	-----
Células medianas			13 a 18	16,75	-----
Células grandes	1,006		17 a 25	22,71	-----

- Con las trayectorias de las poblaciones celulares obtenidos al solucionar las ecuaciones de movimiento y la región de transporte definida por las razones $Q_{a'}/Q = 0.1$ y $Q_a/Q = 0.3$ (ver Figura 3-5), se concluye que es posible separar las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células Schwann por la técnica SPLITT gravitacional, para un flujo total en el canal $Q \leq 2 \text{ ml/h}$, como se ilustra en la Figura 3-7. Es importante recordar que para obtener estos resultados, en la simulación se consideraron células individuales (Single cells) sin interacción con sus vecinas, por lo tanto para encontrar resultados experimentales que puedan ser comparados con estas predicciones teóricas es necesario, al separar, tener un cultivo células de Schwann con la mayor cantidad de células individuales posibles.

Otra manera de lograr enriquecimientos de las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann, podría ser a través de la variación de las dimensiones del canal. En las Figuras 4-2 y 4-3 se muestran, para un experimento²⁸ en el cual se usó una mezcla de partículas de Látex de 5, 10 y $15\mu\text{m}$ de diámetro (ver Figura 4-1), las fracciones recolectadas en las salidas a y b , de un canal Step- SPLITT con un largo $\sim 18\text{cm}$, ancho $\sim 2\text{cm}$ y espesor de $\sim 400\mu\text{m}$. Como se observa en estas figuras es posible hacer enriquecimientos de las partículas de Látex usando las condiciones presentadas en la Tabla 4-2. Por lo tanto si se extrapolan estos resultados experimentales al enriquecimiento de las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann, sería posible en una cámara con estas dimensiones separar estos tipos celulares. Sin embargo, se debe tener cuidado de no tomar los mismos flujos usados en este experimento, ya que estas poblaciones celulares tienen velocidades de sedimentación muy bajas comparadas con las velocidades de las partículas de

²⁸ El montaje y la metodología usada en este experimento, fueron hechos con base en el trabajo presentado en (Springston *et al.* 1987), en el cual, el flujo en la entrada a' se considera constante, lo que permite, a partir de la determinación empírica de este, calcular los demás flujos en el canal. Se debe resaltar que a diferencia del montaje sugerido en (Springston *et al.* 1987), en este caso se usó, para obtener los registros con el Coulter mostrados en las Figuras 4-2 y 4-3, una bomba de succión en la salida b .

Látex (ver Figura 3-3 y Tabla 3-1); por consiguiente, si se desean separar las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann con una cámara de estas dimensiones es necesario usar flujos totales Q menores a los mostrados en la Tabla 4-2, es decir, al comparar con los flujos usados en la simulación (ver Tabla 3-2), que se deben usar flujos totales en el canal que generen velocidades medias, \bar{v} , iguales o menores a $0,3 \text{ mm/s}$.

Figura 4-1: Suspensión inicial de partículas.

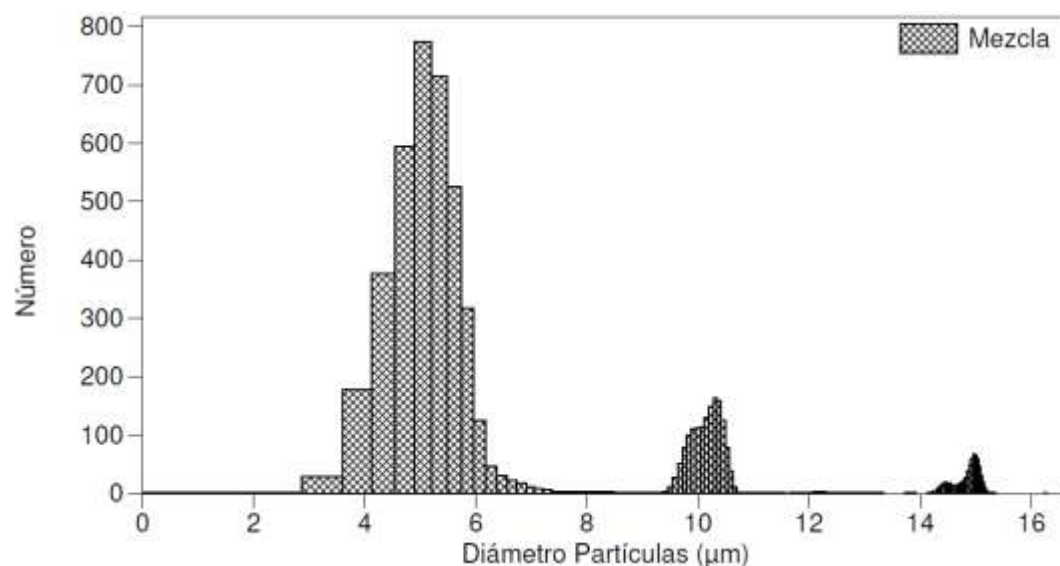


Figura 4-2: Partículas recolectadas en las salidas *a* y *b* para $Q = 38,5 \frac{ml}{h}$.

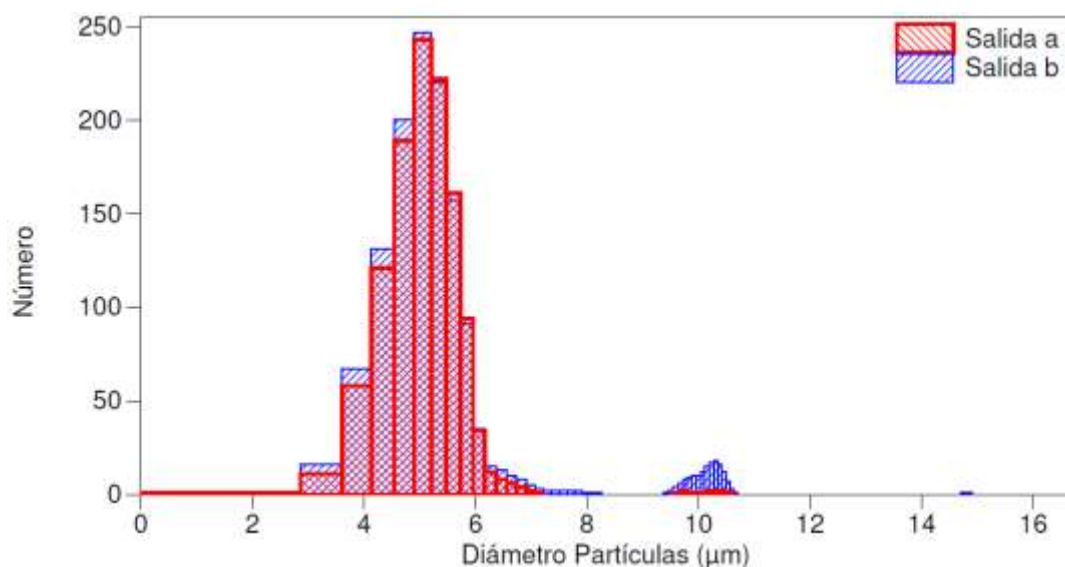
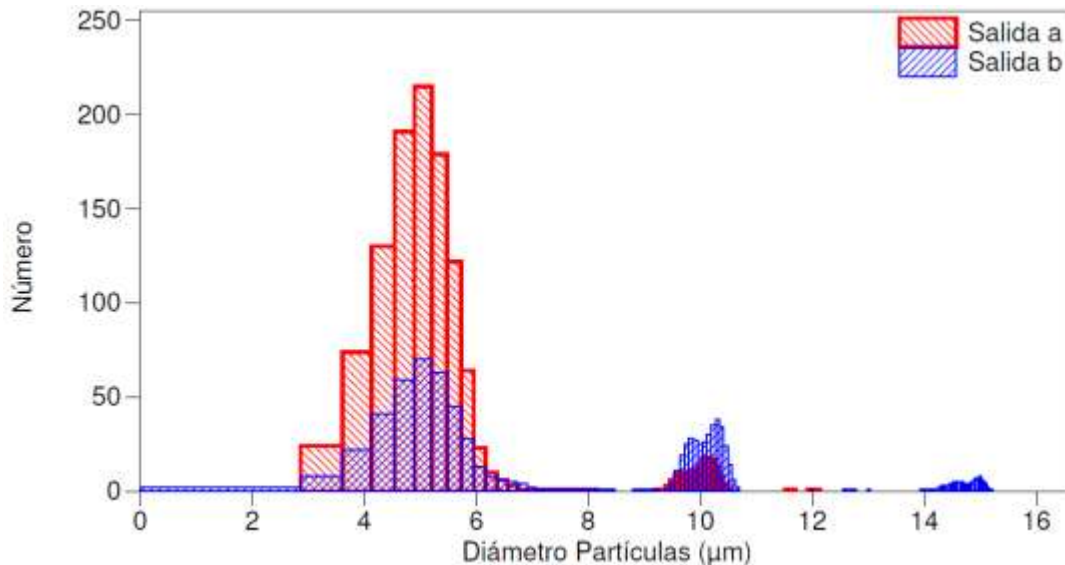


Figura 4-3: Partículas recolectadas en las salidas *a* y *b* para $Q = 69,3 \frac{ml}{h}$.**Tabla 4-2:** Condiciones experimentales para obtener los enriquecimientos mostrados en las Figuras 4-2 y 4-3.

$Q \left(\frac{ml}{h} \right)$	Flujos en las entradas y salidas del canal (ml/h)		$\bar{v} \left(\frac{mm}{s} \right)$	$w_{a'} (\mu m)$	$w_a (\mu m)$	$w_t (\mu m)$
38,5	$Q_{a'} = 16,8$	$Q_{b'} = 21,7$	1,33	181,27	216,03	34,75
	$Q_a = 21,7$	$Q_b = 16,8$				
69,3	$Q_{a'} = 16,8$	$Q_{b'} = 52,5$	2,40	127,49	269,45	141,97
	$Q_a = 52,5$	$Q_b = 16,8$				

Por último se debe notar que para una velocidad media como la sugerida en el párrafo anterior, las poblaciones celulares tardarán aproximadamente 10 *min* en salir de un canal de 18 *cm* de largo, lo que genera mayor manipulación de la muestra, aumentando el riesgo de contaminación del cultivo celular. Además, el canal usado en la separación de las partículas de Látex, tiene un volumen $\sim 1,44 \text{ ml}$, que es grande comparado con el volumen del canal simulado (ver Figura 3-1); por tanto, generaría para muestras con baja concentración, como lo son los cultivos de células Schwann, diluciones considerables en las fracciones recolectadas a las salidas del canal.

- Al solucionar numéricamente las ecuaciones de movimiento para una partícula sedimentándose completamente en el canal, se pudo comprobar que los flujos usados, en la separación gravitacional, tienen una distribución de velocidades de tipo Poiseuille (ver Figura 3-9); además al encontrar sus números de Reynolds (ver Tabla 3-3) se estableció que el fluido en el canal se comporta de forma laminar.
- La simulación permitió comprobar que para una región de transporte igual a la usada en la separación gravitacional, se puede, al someter a las células en el canal a campos acústicos, separar con mejor resolución (mayor separación entre las fracciones recolectadas) y eficiencia (menor tiempo de permanencia en el canal) las poblaciones de células presentes en cultivo de células de Schwann como se muestra en la Figura 3-14.

4.2 Recomendaciones

- Buscar una metodología experimental que permita obtener, desde los primeros días de cultivo, la mayor cantidad de células individuales posibles.
- Hacer separaciones, de las poblaciones celulares presentes en un cultivo de células de Schwann, con la técnica SPLITT en modo de sedimentación gravitacional, para comparar los registros obtenidos con las predicciones hechas por el modelo teórico propuesto en este trabajo. Las cuales permitirán validar el modelo o evidenciar la necesidad de incluir en este, las fuerzas de sustentación hidrodinámica y las fuerzas de interacción entre las células.
- Determinar experimentalmente el valor de la velocidad del sonido en las células, c_{cel} , para incluirlo en la simulación, y, así, obtener teóricamente trayectorias de las poblaciones celulares mas aproximadas a las reales, en las que se muestren los verdaderos efectos del campo acústico sobre estas.
- Fabricar un canal SPLITT acústico, con las dimensiones del canal usado en el trabajo, que permita obtener registros de separaciones de las poblaciones celulares presentes en un cultivo de Schwann por la técnica HASC.

A. Anexo: Flujos en el canal de separación

Si se define, en términos generales, el flujo de líquido pasando a través de una superficie como: la cantidad total de fluido saliente de la superficie por unidad de tiempo, el cual para un elemento de superficie puede ser escrito igual al producto de la componente de la velocidad normal a la superficie por el área de esta superficie (Feynman & Leighton 1964):

$$\text{Flujo} = (\text{componente normal de la velocidad}) \cdot (\text{área de la superficie}) \quad (\text{A-1})$$

Entonces, para el canal de separación Step-SPLITT, donde el elemento de superficie es $Bdx \vec{e}_z$ y la velocidad normal del fluido a esta superficie está dada por $v_z(x) \vec{e}_z$, la ecuación (A-1) se puede expresar de forma integral como:

$$\text{Flujo} = \int v_z(x) B dx \quad (\text{A-2})$$

Donde B es el ancho del canal, dx y la velocidad $v_z(x)$, es la velocidad del fluido a lo largo de la longitud L del canal, la cual está dada por la distribución de velocidades (campo de velocidades) expresa por la ecuación (1.3), que si recordamos, tiene la forma:

$$v_z(x) = 6\bar{v} \frac{x}{w} \left(1 - \frac{x}{w}\right) \quad (\text{A-3})$$

En la que \bar{v} es la velocidad media del flujo y w el espesor del canal.

Usando la ecuación (A-2), a continuación se determinan el flujo total en el canal Q , los flujos en la entrada y salida superior del canal $Q_{a'}$ y Q_a y el flujo de la zona de transporte Q_t .

Flujo total Q en el canal

Sustituyendo la ecuación (A-3) en (A-2) y sacando de la integral a B , w y \bar{v} , que se consideran constantes para un canal de dimensiones fijas y una diferencia constante de

presiones entre las entradas y salidas, se tiene entonces, que el flujo total en el canal es dado por:

$$Q = \frac{6\bar{v}B}{w} \int_0^w \left(x - \frac{x^2}{w}\right) dx \quad (A-4)$$

Que al integrar toma la forma:

$$Q = \frac{6\bar{v}B}{w} \left(\left| \frac{x^2}{2} \right|_0^w - \frac{1}{w} \left| \frac{x^3}{3} \right|_0^w \right) \quad (A-5)$$

Evaluando los límites en la ecuación (A-5):

$$Q = \frac{6\bar{v}B}{w} \left(\frac{w^2}{6} \right) \quad (A-6)$$

Se llega a:

$$Q = \bar{v}Bw \quad (A-7)$$

Que corresponde al flujo total en el canal.

Flujos a la entrada y salida superior del canal ($Q_{a'}$ y Q_a)

Haciendo las mismas consideraciones del caso anterior, pero teniendo en cuenta que el flujo $Q_{a'}$ está dentro de la región delimitada por la pared superior del canal y la posición del plano imaginario ISP, la integral para el flujo $Q_{a'}$ se escribe como:

$$Q_{a'} = \frac{6\bar{v}B}{w} \int_0^{w_{a'}} \left(x - \frac{x^2}{w}\right) dx \quad (A-8)$$

Al integrar (A-8) se obtiene que:

$$Q_{a'} = \frac{6\bar{v}B}{w} \left(\left| \frac{x^2}{2} \right|_0^{w_{a'}} - \frac{1}{w} \left| \frac{x^3}{3} \right|_0^{w_{a'}} \right) \quad (A-9)$$

Evaluando los límites de la integral se llega a:

$$Q_{a'} = 6\bar{v}B \left(\frac{w_{a'}^2}{2w} - \frac{w_{a'}^3}{3w^2} \right) \quad (A-10)$$

Que es el flujo por la entrada a' (ver Figura 1-4).

Para determinar el flujo por la salida a se usa el mismo procedimiento, pero la integral de flujo (A-8) se debe solucionar para los límites 0 y w_a (ver Figura 1-4), que corresponden

a la región delimitada entre la pared superior del canal y el plano imaginario OSP. Entonces al solucionar la integral para este caso se obtiene que el flujo en la salida a es:

$$Q_a = 6\bar{v}B \left(\frac{w_a^2}{2w} - \frac{w_a^3}{3w^2} \right) \quad (\text{A-11})$$

Flujo en la zona de transporte Q_t

Por último, para encontrar el flujo en la región de transporte se debe recordar que esta zona se encuentra delimitada por las posiciones de los planos imaginarios ISP y OSP (ver Figura 1-4), por lo tanto los límites, en este caso, de la integral de flujo en la región de transporte son $w_{a'}$ y w_a :

$$Q_t = \frac{6\bar{v}B}{w} \int_{w_{a'}}^{w_a} \left(x - \frac{x^2}{w} \right) dx \quad (\text{A-12})$$

Haciendo la integral, de la ecuación (A-12) se obtiene que:

$$Q_t = \frac{6\bar{v}B}{w} \left(\left| \frac{x^2}{2} \right|_{w_{a'}}^{w_a} - \frac{1}{w} \left| \frac{x^3}{3} \right|_{w_{a'}}^{w_a} \right) \quad (\text{A-13})$$

Evaluando los límites de la integral, en la ecuación anterior, se llega a:

$$Q_t = 6\bar{v}B \left(\frac{w_a^2}{2w} - \frac{w_{a'}^2}{2w} - \frac{w_a^3}{3w^2} + \frac{w_{a'}^3}{3w^2} \right) \quad (\text{A-14})$$

Agrupando los términos en la ecuación (A-14)

$$Q_t = 6\bar{v}B \left(\frac{w_a^2}{2w} - \frac{w_{a'}^2}{2w} \right) - 6\bar{v}B \left(\frac{w_a^3}{3w^2} - \frac{w_{a'}^3}{3w^2} \right) \quad (\text{A-15})$$

Al comparar los términos de la ecuación (A-15) con las expresiones para los flujos $Q_{a'}$ y Q_a , dados por las ecuaciones (A-10) y (A-11), se concluye que el flujo en la región de transporte puede ser escrito como:

$$Q_t = Q_a - Q_{a'} \quad (\text{A-16})$$

Relación entre los espesores $w_{a'}$ y w_a con los flujos $Q_{a'}$ y Q_a

Para relacionar los espesores $w_{a'}$ y w_a con los flujos $Q_{a'}$ y Q_a , primero se deben normalizar las expresiones (A-10) y (A-11) al dividir las por la ecuación (A-7):

$$\frac{Q_{a'}}{Q} = 3 \left(\frac{w_{a'}}{w} \right)^2 - 2 \left(\frac{w_{a'}}{w} \right)^3 \quad (\text{A-17})$$

$$\frac{Q_a}{Q} = 3 \left(\frac{w_a}{w} \right)^2 - 2 \left(\frac{w_a}{w} \right)^3 \quad (\text{A-18})$$

Es importante notar que (A-17) y (A-18) son ecuaciones cúbicas. Entonces para solucionarlas se introducen (en el caso de la ecuación (A-17)) los parámetros adimensionales:

$$\tilde{w} = \frac{w_{a'}}{w} - \frac{1}{2} \text{ y } \tilde{q} = \frac{Q_{a'}}{Q} - \frac{1}{2} \quad (\text{A-19})$$

Al despejar $\frac{w_{a'}}{w}$ y $\frac{Q_{a'}}{Q}$ en (A-19) y remplazarlos en la ecuación (A-17) se llega a:

$$\tilde{q} + \frac{1}{2} = 3 \left(\tilde{w} + \frac{1}{2} \right)^2 - 2 \left(\tilde{w} + \frac{1}{2} \right)^3 \quad (\text{A-20})$$

Desarrollando el cuadrado y el cubo entre paréntesis, la ecuación (A-20) toma la forma:

$$2\tilde{q} = -4\tilde{w}^3 + 3\tilde{w} \quad (\text{A-21})$$

Ahora usando la identidad cúbica del seno de un ángulo triple:

$$\sin 3x = -4 \sin^3 x + 3 \sin x \quad (\text{A-22})$$

Donde al comparara con (A-21), se puede concluir que $\tilde{w} = \sin x$, por lo tanto, la ecuación (A-21) se puede escribir como:

$$2\tilde{q} = \sin 3x \quad (\text{A-23})$$

Si $3x = \theta$ y remplazando en (A-23) \tilde{q} , se llega a la relación:

$$\sin \theta = 2 \frac{Q_{a'}}{Q} - 1 \quad (\text{A-24})$$

Por último, recordando que:

$$\tilde{w} = \sin x \quad (\text{A-25})$$

Entonces teniendo presente que $x = \frac{\theta}{3}$, al sustituir \tilde{w} en (A-25) se obtiene:

$$\frac{w_{a'}}{w} = \sin \left(\frac{\theta}{3} \right) + \frac{1}{2} \quad (\text{A-26})$$

Que es la solución de la ecuación cubica (A-17), la cual relaciona la posición, $w_{a'}$, del plano imaginario ISP, normalizada por el espesor w del canal, con el flujo en la entrada a' , normalizado por el flujo total en el canal Q . Para determinar la solución de la ecuación (A-18), que relaciona la posición, w_a , del plano de salida OSP con el flujo en la salida a ,

se realiza el mismo procedimiento anterior, pero se cambia en los parámetros adimensionales \tilde{w} y \tilde{q} a w_a y Q_a , por w_a y Q_a , de lo que se obtiene:

$$\sin \theta = 2 \frac{Q_a}{Q} - 1 \quad (\text{A-27})$$

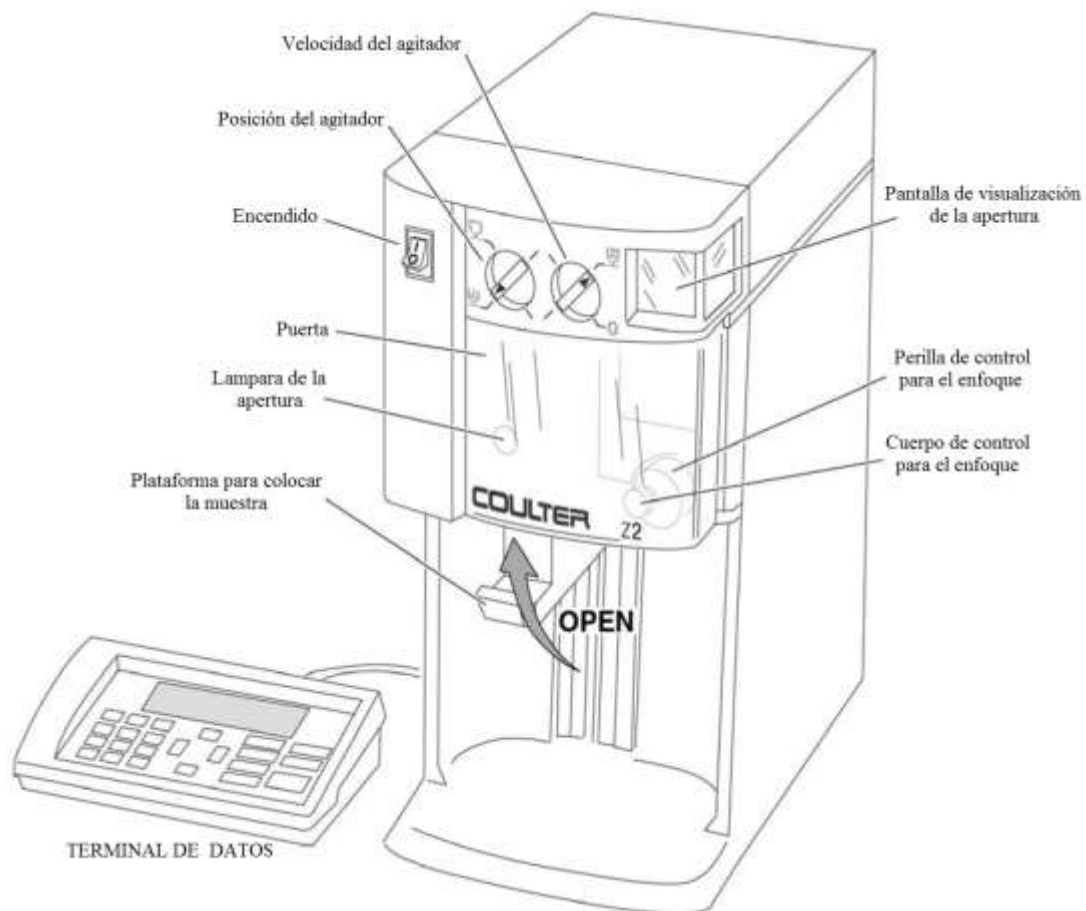
$$\frac{w_a}{w} = \sin\left(\frac{\theta}{3}\right) + \frac{1}{2} \quad (\text{A-28})$$

Donde (A-28) es la solución de la ecuación cubica (A-18).

B. Anexo: El Contador Coulter

Un contador Coulter es un dispositivo, como el ilustrado en la Figura B-1, que permite contar y medir el tamaño de partículas o células suspendidas en una solución electrolítica. Este aparato, fue desarrollado en los años 40 por el inventor estadounidense Wallace H. Coulter, quien determinó que era posible, al usar un campo eléctrico, establecer el tamaño y número de partículas presentes en un líquido conductor.

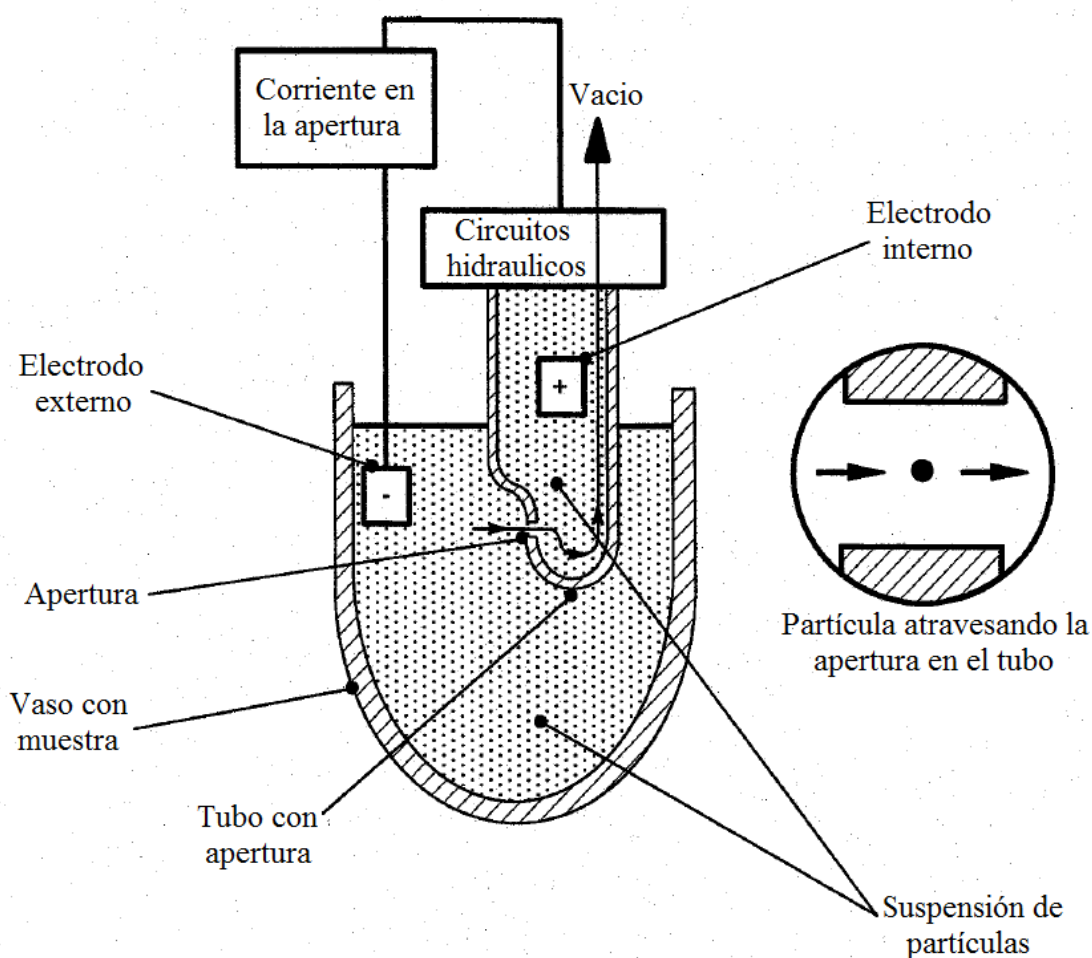
Figura B - 1: Contador de partículas y analizador de tamaños Coulter Z2 (Beckman Coulter 2002).



Principio Básico

El método usado por este aparato para contar y medir el tamaño, está basado en la detección y medición de los cambios en la resistencia eléctrica producida por una partícula o célula, suspendida en un líquido conductor (diluyente), que pasa a través de una pequeña abertura cilíndrica. Al suspender partículas o células en un líquido conductor, estas pueden ser consideradas como pequeñas piezas discretas de material aislante, que al pasar individualmente por un orificio, en el que circula una corriente eléctrica, producen un cambio en la impedancia del circuito eléctrico entre los dos electrodos sumergidos y ubicados a cada lado de la abertura. En la Figura B-2 se ilustra el paso de una partícula a través de una abertura, que genera un pulso eléctrico, causado por el desplazamiento de la solución electrolítica en su interior (Beckman Coulter 2002).

Figura B - 2: Principio básico de un contador Coulter (Beckman Coulter 2002).



Mientras el número de pulsos eléctricos indica el conteo de las partículas, la amplitud de estos pulsos está relacionada con su volumen. La resistencia efectiva entre los dos electrodos es debida a la resistencia del líquido conductor dentro de los límites de la abertura. La presencia dentro de estos límites de una partícula o célula, aumenta la resistencia en el circuito, por una cantidad que depende del volumen de las partículas (Beckman Coulter 2002).

Bibliografía

Amersham Biosciences. Pecoll: Methodology and Applications. 2007.

Beckman Coulter Z series. User Manual 9914591-D. 2002.

Bhagat Ali Asgar S, Kuntaegowdanahalli Sathyakumar s, Papautsky Ian. Inertial microfluidics for continuous particle filtration and estraction. Microfluid Nanofluid (2009) 7:217-226, Springer-Verlag 2008.

Callens Natacha. Développement, etude expérimentale et visaalisation par holographie digitale de mini-séparateurs fluidiques (STEP-SPLITT) en vue de la séparation d'objects de taille micrométrique. Thèse de doctorat de l'université Paris 6. Diciembre 22 de 2005.

Callens Natacha, Hoyos Mauricio, Kurowski Pascal, and Iorio Carlo S. Particle Sorting In a Mini Step-Split-Flow Thin Channel: Influence of Hydrodynamic Shear on transversal Migration. Anal. Chem. 2008, 80, 4866-4875.

Camacho Marcela, Hoyos Mauricio, Navarrete Iván, Vargas Abelino, Urbina Adriana, Ochoa Carolina & Zapata Cristina. Sistemas de separación y clasificación celular en corto tiempo, con bajo costo y alta eficiencia: uso de levitación acústica y fuerzas hidrodinámicas. Proyecto aprobado por Colciencias en la convocatoria 569, Noviembre de 2012.

Campenot R. B. In: Cell-cell interactions: A practical approach. En: Stevenson BR, Gallin WJ, Paul DL. Editor. Oxford: IRL press; 1993; p.275-298.

Cengel Yunus A & Cimbala John M. Fluid Mechanics – Fundamentals and Applications. Editorial McGRAW–HILL, 2006.

Chen Z, Yu W, & Strickland S. Peripheral Regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2007. 30:209-33.

Contado C, Riello F, Blo G, Dondi F. Continuous Split flow-thin cell fractionation of starch particles. *Journal of Chromatography A*, 845 (1999);303-316.

Contado C. Split Flow Thin Cell (SPLITT) Separation. University of Ferrera, Ferrera, Italy. Copyright 2000 Academic Press.

Contado C., Hoyos M. SPLITT cell analytical separation of silica particles. Non-Specific crossover effects: Does the shear-induced diffusion play a role?. *Chromatographia* Volume 65, Numbers 7-8 (2007), 453-462.

Feynman Richard P, Leighton Robert B, Sands Matthew. The Feynman Lectures on Physics, Mainly Electromagnetism and Matter, Volumen II. Addison-Wesley Publishing Company, 1964.

Fuh Chwan Bor, Myers Marcus N, and Giddings J. C. Analytical SPLITT Fractionation: Rapid Particle Size Analysis and Measurement of Oversized Particles. *Analytical Chemistry*, Vol 64, No. 24, pp. 3125-3132, December 15, 1992.

Fuh Chwan Bor, Myers Marcus N, and Giddings J. C. Centrifugal SPLITT Fractionation: New Technique for Separation of Colloidal Particles. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1994, 33, 355-362.

Fuh C. Bor, Chen S. Y. Magnetic split-flow thin fractionation: new thecnique for separation of magnetically susceptible particles. *Journal of Chomatography A*, 813 (1998) 313-324.

Fuh C. Bor. Split-flow thin Fractionation. *Analytical Chemistry*. April 1, 2000, pag 266A-271A.

Giddings J. C. A system based on Split-flow lateral-transport thin (SPLITT) separation cells for rapid and continuous particle fractionation. *Sep. Sci. Technol*, 20(1985) 749-68.

Giddings J. C. High speed separation of ultra-high molecular weight polymers by hyperlayer field-flow fractionation. Patent Number: 4,830,756. United States Patent, May 16, 1989.

Giddings J. C. Process for continuous particle and polymer separation in split-flow thin cells using flow-dependent lift forces. Patent Number: 5,039,426. United States Patent, Aug. 13, 1991.

Giddings J. C. Optimization of Transport-Driven Continuous SPLITT Fractionation. *Separation Science and Technology*, 27(11), pp. 1489-1504, 1992.

Giddings J. C. Method and apparatus for hydrodynamic relaxation and sample concentration in field-flow fraction using permeable wall elements. Patent Number: 5,193,688. United States Patent. Mar. 16, 1993.

Gossett Daniel R., Weaver Westbrook M., Mach Albert J., Claire Hur Soojung., Tat Kwong Tse Henry, Lee Wonhee, Amini Hamed, Di Carlo Dino. Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem* 397: 3249-3267, 2010.

Guerrero Cindy. Separación de células de Schwann por el método SPLITT. Bogotá DC, Universidad Nacional de Colombia; 2010.

Guenard V, Aebischer P., Bunge RP. The astrocyte inhibition of peripheral nerve regeneration is reversed by Schwann cells. *Exp Neuro*. 1994;126:44-60.

Hibberd F. H. A Simple Arrangement for a Rotating Cylinder Viscometer. *AJP*, Volumen 20, Number 3, March 1952.

Hjorth-Jensen Morten. Computational Physics, Lecture Notes. University of Oslo, October 14, 2011.

Hoyos Mauricio, Moore Lee R, McCloskey Kara E, Margel Shlomo, Zuberi Merav, Chalmers Jefferey J, Zborowski Maciej. Study of magnetic particles pulse-injected into an annular SPLITT-like channel inside a quadrupole magnetic field. *Journal of Chromatography A*, 903 (2000) 99-116.

Hoyos Mauricio. SEPARACIÓN HIDRODINÁMICA DE MACROMOLÉCULAS, PARTÍCULAS Y CÉLULAS. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. No. 1, 2003.

Hoyos Mauricio, Niño Andrea, Camargo Manuel, Diaz Juan Carlos, León Sonia, Camacho Marcela. Separation of Leishmania-infected macrophages by step-SPLITT fractionation. *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 3712-3718.

Hu J, Zhou J, Li X, Wang F, Lu H. Schwann cells promote neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons through secretion of nerve growth factor. *Indian J Exp Biol*. 2011;49(3):177-182.

Hughes William F., Brighton John A. TEORIA Y PROBLEMAS DE DINÁMICA DE FLUIDOS. Serie de compendios Schaum. Editorial McGRAW-HILL, 1970.

Jiménez José, Naranjo Jorge. Flujos Hele Shaw: Un Siglo de Aplicaciones. *AVANCES EN RECURSOS HIDRAULICOS*, Número 1, PP. 59-67,1993.

Lavin Shulamit, Giddings J.C. Continuous Separation of Particles from Macromolecules in Split-Flow Thin (SPLITT) Cells. *J. Chem. Tech Biotechnol*. 1991, 50, 43-56.

Kim D.H, Connolly S.E, Kline D.G, Voorhies R.M, Smith A, Powell M, et al. Labeled Schwann cell transplants versus sural nerve grafts in nerve repair. *J Neurosurg*. 1994;80:254-260.

Lee Seungho, Park Hee-Young, Lee Sang-Keun, Yang Sung-Gwon, and Hun Eum Chul. Separation and Characterization of Dust and Ground Water Particulates Using Gravitational SPLITT Fractionation. *Bull Korean Chem. Soc*. 2001, Vol. 22, No. 6.

Liard Maxime. Séparation de particules micrométricas à l'aide d'un dispositif Halbach. Projet de recherche réalisé au laboratoire de Physique et Mécanique des Milieux Hétérogènes (PMMH) à l'ESPCI ParisTech. Julio de 2010.

López A., Hurtado H. La célula de Schwann. *Biomédica*. 1993;13:207-217.

Morrissey T. K, Kleitman N. & Buge R. P. Isolation and functional characterization of schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci K*. 1991;11:2433.

Nordon RE, Schindhelm K. Cell Separation. In: Klaus S, Robert N, editors. *Ex Vivo Cell Therapy*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 215-43.

Ochoa C, Perdomo S, Moreno CM, Vivas O, Leal L, Spinel C. Cultivos de células de nervio ciático y de ganglio de la raíz dorsal de ratón adulto. Universidad Nacional de Colombia, 2010.

Perdomo S, Camargo L.H. Análisis morfológico de la regeneración de nervio ciático de rata adulta crónicamente denervado implantado con células de Schwann autólogas. Trabajo de Grado. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2001.

Perdomo S, Spinel C. La célula de Schwann. *Acta biol Colomb*. 2004;9(2):25-34.

Perez C. Caracterización electrofisiológica de las corrientes iónicas de la membrana de la vacuola parasitófora de macrófagos infectados con *Leishmania amazonensis*. Bogotá DC, Universidad Nacional de Colombia; 2009.

Press William H, Teukolsky Saul A, Vetterling William T, Flannery Brian P. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*, Second Edition. Cambridge University Press, 1992.

Ratier Clere. Étude et réalisation d'un dispositif de séparation acoustique et de son application à des objets biologiques. Thèse de doctorat de l'université Paris VII. Julio 12 de 2009.

Ratier Claire & Hoyos Mauricio. Acoustic Programming in Step-Split-Flow Lateral-Transport Thion Fractionation. *Anal. Chem.* 2010, 82, 1318-1325.

Roda B, Reschiglian P, Zattoni A, Alviano F, Lanzoni G, Costa R, Di Carlo AD, Marchionni C, Franchina M, Bonsi L, Bagnara GP, A tag-less method of sorting stem cells from clinical specimens and separating mesenchymal from epithelial progenitor cells. *Cytometry B-Clinical Cytometry* 2009, 76B:285-290.

Rogan C. Jose, Muñoz G. Victor. Apuntes de un curso de: Programación y Métodos Numéricos. Novena edición, Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, 2002.

Springston Stephen R, Myers Marcus N, and Giddings J. C. Continuous Particle Fractionation Based on Gravitational Sedimentation in Split-Flow Thin Cells. *Anal. Chem.* 1987, 59, 344-350.

Spinel C, Hoyos M, Marin M, Dominguez D, Cortes G, Camacho M. Prototipos para generar sistemas de separación celular en corto tiempo, con bajo costo y alta eficiencia. Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física (CIF): Laboratorio asociado a la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia: Colciencias; 2007.

Stancio L, Shute J, Holgate S, Djukanovic R. Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected CD4+ and CD8+ human T cells following a four-step cell separation method including magnetic cell sorting (MACS). *Journal of Immunological Methods.* 1996;189:107-15.

Suderland S. Nervios periféricos y sus lesiones. Bioquímica de la degeneración Walleriana en el capítulo: Degeneración, regeneración y clasificación de las lesiones de los nervios. Barcelona: Salvat Editores; 1985; 95-7.

Taniuchi M., Brent Clark H, Johnson M. induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(11):4094-98.

Townsend R.J, Hill M, HARRIS N.R, White N.M. Modelling of particle paths passing through an ultrasonic standing wave. *Ultrasonics* 42 (2004) 319-324.

Vargas M.E, Barres B.A. Why is wallerian degeneration in the CNS so slow?. *Annu. Rev.Neurosci.*2007. 30:153-179.

Van den Berg L.H, Bar P.R, Sodaar P, Mollee I, Wokke J.H, Logtenberg T. Selective expansion and long term culture of human Schwann cells from sural nerve biopsies. *Ann Neurol.* 1995;38:674-678.

Velasco Kelly. Características de solubilidad de proteínas reconocidas por anticuerpos monoclonales en *Plasmodium falciparum* (Plasmodiidae). Bogotá DC, Universidad Nacional de Colombia, 2010.

Williams P. Stephen, Levin Shulamit, Lenczycki Timothy, and Giddings J. C. Continuous Splitt Fractionation Based on a Diffusion Mechanism. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1992, 31, 2172-2181.

Williams P. Stephen. Particle Trajectories in Field-Flow Fractionation and SPLITT Fractionation Channels. *Separation science and technology*, 29(1), PP. 11-45, 1994.

Wilson I, Adlar E, Poole C, Cooke M. *Encyclopedia of Separation Science*, Ten-Volume Set: ACADEMIC PR INC; 2000.

Xu X, Guenard V, Kleitman N & Bunge M. Axonal Regeneration Into Schwann Cell-Seeded Guidance Channels Grafted Into Transected Adult Rat Spinal Cord. *J Comp Neurol.* 1995;351:145-160.

Zhang Jue, Williams P. Stephen, Myers Marcus N. and Giddings C. Separation of Cells and Cell-Sized Particles by Continuous SPLITT Fractionation Using Hydrodynamic Lift Forces. *Separation science and technology*, 29(18), PP. 2493-2522, 1994.